

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka



RNDr. Dana Sedláčková

Postprandiální změny hormonů příjmu potravy u pacientek s anorexia nervosa a bulimia nervosa

Postprandial changes of gastrointestinal hormones in patients with anorexia nervosa and bulimia nervosa

Disertační práce

Školitel: RNDr. Jara Nedvídková, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25.05.2012

Dana Sedláčková

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Jaře Nedvídkové, CSc., za laskavé vedení této disertační práce, za poskytnuté cenné odborné rady a předané zkušenosti. Děkuji i laborantkám Dianě Riegerové a Nadě Procházkové za spolupráci při laboratorních stanoveních a ing. Martinu Hillovi za pomoc při statistickém zpracování dat. Dále bych ráda poděkovala celé své rodině za projevenou trpělivost, toleranci a podporu.

OBSAH

Abstrakt	7
Seznam zkratek	9
1 ÚVOD	11
1.1 Anorexia nervosa a bulimia nervosa	12
1.2 Regulace příjmu potravy	14
1.2.1 Ghrelin	17
1.2.1.1 Struktura a formy ghrelinu	17
1.2.1.2 Fyziologické účinky ghrelinu	18
1.2.1.3 Ghrelin a poruchy příjmu potravy	22
1.2.2 Obestatin	23
1.2.2.1. Struktura obestatinu	23
1.2.2.2. Fyziologické účinky obestatinu	24
1.2.2.3 Obestatin a poruchy příjmu potravy	24
1.2.3 Neuropeptid Y	25
1.2.3.1. Struktura neuropeptidu Y	25
1.2.3.2. Fyziologické účinky neuropeptidu Y	25
1.2.3.3 NPY a poruchy příjmu potravy	26
1.2.4 Peptid YY	26
1.2.4.1. Struktura a formy peptidu YY	26
1.2.4.2 Fyziologické účinky peptidu YY	27
1.2.4.3 Peptid YY a poruchy příjmu potravy	28
1.2.5. Leptin	29
1.2.5.1 Struktura leptinu	29
1.2.5.2 Fyziologické účinky leptinu	29
1.2.5.3 Leptin a poruchy příjmu potravy	30
2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	32
3 MATERIÁL A METODY	33
3.1 Studované soubory	33
3.2 Průběh studie	34

3.2.1 Studie I	34
3.2.2 Studie II–IV	35
3.3 Metody stanovení hormonů	38
3.3.1 Zpracování odebrané krve	38
3.3.2 Stanovení hormonů metodou RIA	38
3.3.2.1 Stanovení total ghrelinu	39
3.3.2.2 Stanovení obestatinu	41
3.3.2.3 Stanovení neuropeptidu Y	43
3.3.2.4 Stanovení peptidu YY	45
3.3.2.5 Stanovení leptinu	47
3.3.3. Stanovení hormonů metodou ELISA	48
3.3.3.1 Stanovení acyl ghrelinu	48
3.3.3.2 Stanovení desacyl ghrelinu	50
3.4 Statistické zpracování dat	52
4 VÝSLEDKY	55
4.1. Studie I	55
4.2. Studie II	55
4.3. Studie III	56
4.4. Studie IV	59
5 DISKUZE	63
5.1 Studie I	63
5.2 Studie II	64
5.3 Studie III	66
5.4 Studie IV	68
6 ZÁVĚR	71
Seznam použité literatury	73
Seznam obrázků	87
Přílohy: Tabulky	88
Přílohy: Grafy	107
Publikační činnost	122

Abstrakt

Úvod: Záměrem této práce bylo přispět k současnému výzkumu gastrointestinálních peptidů ghrelinu, obestatinu, neuropeptidu Y (NPY) a peptidu YY (PYY) u pacientek s anorexia nervosa (AN) a bulimia nervosa (BN). Tyto hormony mají důležitou úlohu při regulaci příjmu potravy a energetické homeostázy a jejich sekrece je narušená u osob s poruchami příjmu potravy. Protože konzumace různých nutrientů může vyvolávat různé plazmatické reakce těchto hormonů, sledovali jsme plazmatické hladiny ghrelinu, obestatinu, NPY a PYY po konzumaci snídaně s vysokým obsahem sacharidů (HC) a snídaně s vysokým obsahem proteinů (HP) v rámci jídelních testů prováděných pod lékařským dohledem.

Metody: Sledovány byly plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové a proteinové snídaně u pacientek s AN (celkem $n=14$; age: $24,6 \pm 1,8$ years, BMI: $15,3 \pm 0,7$), BN (celkem $n=15$; age: $23,2 \pm 1,7$ years, BMI: $20,5 \pm 0,9$) a zdravých žen (celkem $n=14$; age: $24,9 \pm 1,4$ years, BMI: $21,1 \pm 0,8$). Krev byla odebírána z kubitální žíly s použitím intravenózní kanyly, první odběr proběhl před jídlem a další odběry v časech 30, 60, 90, 120 a 150 min po jídle. Plazmatické hladiny hormonů byly stanoveny při použití komerčně dostupných RIA kitů.

Výsledky: Pacientky s AN i BN měly významně zvýšené bazální i postprandiální hladiny obestatinu, zatímco hladiny ghrelinu měly zvýšené pouze pacientky s AN. Po konzumaci snídaně hladiny ghrelinu i obestatinu klesly, ale zůstaly stále vyšší, než hodnoty zdravých žen. Bazální hladiny NPY byly u pacientek s AN i BN zvýšené a postprandiálně se neměnily. Bazální hladiny PYY byly srovnatelné u pacientek s AN, BN i zdravých žen, ale postprandiálně se významně zvýšily u pacientek s AN i BN po proteinové snídani. Zjistili jsme odlišné reakce ghrelinu a PYY na podání snídaní mezi sledovanými skupinami, zatímco reakce obestatinu a NPY se mezi skupinami nelišily.

Závěr: Významně zvýšené hladiny obestatinu a NPY u pacientek s AN a BN by mohly ukazovat na jejich důležitou úlohu jako markerů poruch příjmu potravy. Odlišné reakce ghrelinu a PYY na konzumaci snídaní mezi skupinami naznačují, že úloha těchto hormonů v regulaci energetické homeostázy může být přizpůsobena v závislosti na aktuálním stavu onemocnění poruchou příjmu potravy.

Abstract

Background: The present work was aimed to contribute to current research of gut-brain axis peptides ghrelin, obestatin, neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY) in women patients with anorexia nervosa (AN) and bulimia nervosa (BN). These hormones play an important role in regulation of food intake and energy homeostasis and their secretion is disturbed under conditions of eating disorders. Various types of consumed macronutrients may induce different plasma hormone responses, therefore we studied plasma levels of ghrelin, obestatin, NPY and PYY after consumption of a high-carbohydrate (HC) and high-protein (HP) breakfast within the meal tests performed under medical supervision.

Methods: Plasma hormone responses to high-carbohydrate and high-protein breakfast were examined in patients with AN (total n = 14; age: $24,6 \pm 1,8$ years, BMI: $15,3 \pm 0,7$), BN (total n = 15; age: $23,2 \pm 1,7$ years, BMI: $20,5 \pm 0,9$) and healthy controls (total n = 14; age: $24,9 \pm 1,4$ years, BMI: $21,1 \pm 0,8$). Blood samples were drawn from the cubital vein using an intravenous cannula, the first blood drawn was collected before meal, and then 30, 60, 90, 120 and 150 min after breakfast consumption. Plasma hormone levels were determined by commercially available RIA kits.

Results: Fasting and postprandial plasma obestatin levels were significantly increased in both AN and BN patients, while plasma ghrelin levels were significantly increased in AN patients only. After breakfast consumption, plasma levels of ghrelin and obestatin decreased, although they were still above the range of values of healthy women. Fasting NPY plasma levels were significantly increased in AN and BN patients and did not change postprandially. Fasting PYY levels were comparable in AN, BN and healthy controls, but postprandially significantly increased after HP breakfast in AN and BN patients. Different reactions to breakfast consumption were found for ghrelin and PYY among investigated groups, while for obestatin and NPY these reactions did not differ in all groups.

Conclusions: Significant increase of obestatin and NPY in AN and BN patients may indicate their important role as the markers of eating disorders. Different reactions of ghrelin and PYY to breakfast consumption among groups suggest that role of these hormones in regulation of energy homeostasis could be adjusted in dependence to acute status of eating disorder.

Seznam zkratek

α -MSH	α -melanocyty stimulující hormon
β -MSH	β -melanocyty stimulující hormon
¹²⁵ I	izotop jódu s nukleonovým číslem 125
ACTH	adenokortikotropní hormon
AgRP	agouti related peptide
AN	anorexia nervosa
ARC	nucleus arcuatus
BMI	body mass index
BN	bulimia nervosa
Bq	becquerel
CART	cocaine amphetamine regulated transcript
CCK	cholecystokinin
Ci	curie
CNS	centrální nervová soustava
cpm	counts per minute
CRH	corticotropin releasing hormone
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition, American Psychiatric Association, 1994
DPP-IV	dipeptidylpeptidáza IV
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
FM	fat mass
GH	growth hormone
GHRH	growth hormone releasing hormone
GHS	growth hormone secretagogue
GHS-R	growth hormone secretagogue receptor
GIT	gastrointestinální trakt
GPCR	G-protein coupled receptor
HCl	kyselina chlorovodíková
IGF-1	insulin like growth factor 1

IGFBP-3	insulin like growth factor binding protein 3
IgG	imunoglobulin G
LBM	lean body mass
LHA	laterální oblast hladu
mRNA	messenger ribonucleic acid
MKN-10	mezinárodní klasifikace nemocí
NPY	neuropeptid Y
NTS	nucleus tractus solitarius
OB-R	leptinový receptor
POMC	proopiomelanocortin
p-value	hladina významnosti testu
<i>r</i>	korelační koeficient
PVN	nucleus paraventricularis
PYY	peptid YY
PRL	prolaktin
RIA	radioimmunoassay
SEM	střední chyba průměru
VMN	nucleus ventromedialis
Y	aminokyselina tyrosin

1 ÚVOD

Příjem potravy a chuť k jídlu jsou řízeny centrální nervovou soustavou s klíčovou úlohou hypotalamu, který na základě interakcí periferních hormonálních, metabolických a nervových signálů kontroluje všechny činnosti spojené s energetickou rovnováhou organismu. Peptidy účastnící se signalizace mezi trávicí soustavou a mozkem mají hlavní úlohu v regulaci energetické homeostázy, a jejich sekrece je narušena při poruchách příjmu potravy, včetně onemocnění anorexia nervosa (AN) a bulimia nervosa (BN). Tato psychická a somatická onemocnění jsou charakterizována abnormálním jídelním chováním a poruchami energetické rovnováhy a vyskytují se převážně u mladých žen. Výzkumem bazálních i postprandiálních hladin hormonů, které se účastní krátkodobé i dlouhodobé regulace příjmu potravy, se zabývá množství studií, výsledky uváděné pro pacienty s poruchami příjmu potravy se však často liší.

Záměrem této práce bylo přispět k současnému výzkumu ghrelinu, obestatinu, neuropeptidu Y a peptidu YY v regulaci příjmu potravy u pacientek s anorexia a bulimia nervosa a pomoci tak objasnit činnost těchto hormonů za normálních i patofyziologických podmínek. Tato práce byla součástí rozsáhlého výzkumu, podpořeného grantovým projektem IGA MZ ČR NR/9158-3.

1.1 Anorexia nervosa a bulimia nervosa

Poruchy příjmu potravy představují spektrum psychosomatických poruch charakterizovaných převážně psychogenně navozeným maladadaptivním jídelním chováním. Anorexia nervosa, bulimia nervosa a některé formy obezity mohou představovat opačné póly patofyziologie regulace tělesné hmotnosti. V poslední době přitahují stále větší pozornost díky celosvětově rostoucí incidenci (Papežová, 2004).

Příznaky anorexia nervosa byly popsány již Galénem ve 2. století. První lékařský popis anorexie se obvykle přičítá až R. Richardu Mortonovi z Velké Británie v roce 1694, který definoval anorexii jako onemocnění psychického původu. Také bulimická symptomatologie byla popisována již ve starověku, přesto jako diagnostická jednotka byla bulimia nervosa poprvé zavedena do DSM-III až v roce 1980 G. Russelem (Papežová, 2004).

Od 60. let incidence i prevalence onemocnění výrazně stoupala. Udává se, že asi 1–3 % žen v rizikovém věku (15–30 let) splňuje kritéria pro bulimia nervosa a asi 0,5–1 % pro anorexia nervosa (Papežová, 2004). Celoživotní prevalence je u žen udávána 0,5 % pro anorexia nervosa u zúžených kritérií a až 3,7 % u širších kritérií a 1,1–4,2 % pro bulimia nervosa (Krch, 2005). Začátek onemocnění je bimodálně rozložen na věk 14–15 let a 17–18 let. V 90–95 % se porucha vyskytuje u mladých žen a dívek, vzácněji jsou postiženi mladí chlapci a muži, i děti před pubertou a starší ženy. Epidemiologické údaje jsou však vzhledem k povaze onemocnění (popírání a tajení obtíží a odmítání odborné pomoci) problematické. Onemocnění se rozšířilo natolik, že již neplatí původní omezení výskytu na vyšší a střední vrstvy západních industrializovaných zemí (Papežová, 2004).

Diagnostická kritéria anorexia nervosa a bulimia nervosa

Diagnostická kritéria podle MKN-10:

Mentální anorexie (F50.0)

- je charakterizována především snižováním váhy nebo udržováním podváhy, které si pacientka úmyslně způsobuje a udržuje sama. Klinické rysy syndromu jsou následující, pro definitivní diagnózu musí být přítomny všechny uvedené příznaky:

- A. Tělesná hmotnost je udržována nejméně 15 % pod předpokládanou hmotností (ať již byla snížena nebo jí nikdy nebylo dosaženo) nebo Queteletův index tělesné hmotnosti (body mass index, BMI) je 17,5 nebo méně.
- Prepubertální pacienti nesplňují během růstu očekávaný váhový přírůstek.
- B. Patientka si snižuje hmotnost sama, dietami, navozeným zvracením, užíváním diuretik, anorektik, laxativ či excesivním cvičením.
- C. Specifická psychopatologie spočívá v přetrvávajícím strachu z tloušťky i při výrazné podvázce, zkreslených představách o vlastním těle a ve vtíravých, ovládacích myšlenkách na udržení nízké váhy.
- D. Rozsáhlá endokrinní porucha hypothalamo-pituitární-gonádové osy, u žen je vyjádřena především amenoreou (s výjimkou vaginálního krvácení při užití hormonální antikoncepce), u mužů ztrátou sexuálního zájmu.
- E. Při začátku onemocnění před pubertou je puberta opožděna nebo zastavena (růst, vývoj prsou, primární amenorea, dětské genitály u chlapců). Po uzdravení dochází k normálnímu dokončení puberty, i když menarché může být opožděna.

DSM-IV klasifikace dále dělí AN na:

- 1) Restriktivní typ – v průběhu nemoci je pacient/ka bez epizod přejídání a vyvolávaného zvracení a bez zneužívání laxativ a diuretik.
- 2) Purgativní typ – pacient/ka trpí epizodami přejídání a následného zvracení.

Mentální bulimie (F50.2)

- je charakterizována opakovanými záchvaty přejídání velkým množstvím kalorické stravy, tzv. „binge-eating“ a přehnanou patologickou kontrolou tělesné váhy. Začíná později než anorexia nervosa. V anamnéze se více než v 50 % vyskytují plně vyjádřené nebo skryté epizody mentální anorexie s podvážou a/nebo amenoreou a dietní chování. Klinické rysy

syndromu jsou následující, pro definitivní diagnózu musí být přítomny všechny uvedené poruchy:

A. Neustálé zabývání se jídlem, neodolatelná touha po jídle a záchvaty přejídání s konzumací velkých dávek jídla během krátké doby.

B. Snaha potlačit kalorický (výkrmný) účinek jídla jedním (nebo více) z následujících způsobů: vyprovokovaným zvracením, hladovkami, anorektiky, laxativy, diuretiky, thyreoidálními preparáty, u diabetických pacientů manipulací s inzulínovou léčbou. Restriktivní a bulimické subtypy se mohou střídat.

C. Specifická psychopatologie spočívá v chorobném strachu z tloušťky, ve snaze udržet si nižší než premorbidní váhu (optimální či zdravou).

DSM-IV klasifikace dále dělí BN na:

1) Typ se zvracením.

2) Typ vymezený pouze dietami a excesivním cvičením, které se střídají s přejídáním.

(Papežová, 2004; Krch, 2005).

1.2 Regulace příjmu potravy

Na příjmu potravy a regulaci jejího množství se podílejí dva systémy – krátkodobá regulace příjmu potravy, která zahrnuje zejména prevenci přejedení při každém jídle, a dlouhodobá regulace, která souvisí především s udržováním normálního množství energetických zásob ve formě tělesného tuku. Regulace tělesné hmotnosti je založená na homeostatickém systému, tento systém je však seřízen směrem k přibývání tělesné hmotnosti a ukládání tukových zásob, zatímco existuje pouze málo mechanismů, které podporují ztrátu hmotnosti (Druce et al., 2004). Energetická rovnováha je z dlouhodobého hlediska přesně určená, navzdory každodenním změnám v příjmu potravy a energetickém výdeji. Klíčovou oblastí v centrálním nervovém systému pro příjem potravy je hypothalamus, který je zahrnutý do zpětnovazebné kontroly chuti k jídlu a příjmu potravy.

Důležitými centry v hypotalamu pro kontrolu příjmu potravy jsou nucleus arcuatus (ARC) a nucleus paraventricularis (PVN). Nucleus ventromedialis (VMN) slouží jako centrum sytosti a laterální hypotalamická oblast (LHA) jako centrum hladu. V současné době platí hypotéza, že centrum hladu je chronicky aktivní a jeho aktivita může být přechodně tlumena účinky centra sytosti, která nastává po konzumaci jídla. Při krátkodobé regulaci energetického příjmu kontrolují struktury mozku příjem jednotlivých jídel ve vztahu k jejich objemu, energetickému obsahu a délce trvání. Po konzumaci potravy jsou signály z receptorů v orofaryngeální a žaludeční oblasti předány do mozkového kmene cestou aferentních nervů. Na přenosu periferních signálů z gastrointestinálního traktu a pankreasu se podílí chemická stimulace receptorů v gastrointestinální mukose a uvolňování různých hormonů z gastrointestinální mukosy s orexigenními a anorexigenními účinky, v reakci na přítomnost nutrientů (Konturek et al., 2005).

CNS přijímá, zejména prostřednictvím nucleus tractus solitarius (NTS), četné nervové impulsy a hormony z periferních orgánů, zejména z gastrointestinální mukosy a z tukové tkáně, které jsou zahrnuty v krátkodobé a dlouhodobé regulaci příjmu potravy a energetického výdeje, jako odpověď na nepřetržitě se měnící energetickou rovnováhu (Konturek et al., 2005). Peptidy gastrointestinálního traktu působí na centra v ARC v hypothalamu po navázání na receptory neuronů, které podněcují chuť k jídlu a obsahují neuropeptid Y (NPY) a agouti-related peptid (AgRP), nebo apetit inhibujících neuronů, které obsahují proopiomelanokortin (POMC), α -melanocyty stimulující hormon (α -MSH), β -melanocyty stimulující hormon (β -MSH) a peptidy transkripčně regulované kokainem a amfetaminem (cocaine amphetamine regulated transkript, CART) (Nedvídková et Nedvídek, 2007). Orexigenní molekuly NPY a AgRP jsou exprimovány ve stejných neuronech v centru hladu v mediálním ARC, zatímco anorexigenní molekuly POMC a CART jsou exprimovány v centru sytosti v laterálním ARC. Aktivace orexigenních AgRP-NPY neuronů zvyšuje chuť k jídlu a metabolismus, zatímco aktivace melanokortinových neuronů má opačný efekt. Nucleus arcuatus propojuje neurální a humorální vstupy peptidů včetně orexigenních – ghrelin a orexiny, a anorexigenních peptidů – cholecystokinin, polypeptid YY (PYY), glucagon-like peptide-1, oxyntomodulin, leptin a další, které uplatňují fyziologickou úlohu v regulaci chuti k jídlu a sytosti. (Pfaff et al, 2004). Centrální regulace příjmu potravy zahrnuje komplexní vztahy mezi neuropeptidy, mediátory,

monoaminy a dalšími mozkovými přenašeči informací na různých hladinách nervového systému (Nedvídková et Nedvídek, 2007).

Hlavním gastrointestinálním hormonem se silnými orexigenními účinky je ghrelin (Kojima et al., 1999). Plazmatické hladiny ghrelu stoupají při hladovění a po konzumaci jídla klesají na minimální hodnoty, aby se opět zvýšily po vyprázdnění žaludku před příjmem dalšího jídla (Cummings et al., 2001). Existují dva hlavní mechanismy přenosu periferního ghrelu do hypotalamu, buď transport krevním řečištěm a přímý kontakt s neurony ARC nebo prostřednictvím aferentních drah nervu vagu do mozkového kmene, kde působí na nucleus tractus solitarius, které dále komunikuje s hypotalamem. Ghrelin produkovaný v mozku působí na buňky nervových center přímo (Korbonits et al., 2004). Hlavním cílem ghrelu jsou neurony v ARC, které exprimují a uvolňují NPY a AgRP v laterálním hypotalamu a zprostředkovávají orexigenní signály v mozku. Ghrelin však může také inhibovat neurony v ARC, které obsahují α -MSH a zprostředkovávají anorexigenní efekt v PVN (Konturek et al., 2005).

Dále bylo identifikováno velké množství anorexigenních peptidů, které jsou exprimovány v gastrointestinálním traktu a také v hypotalamickém ARC, které inhibují příjem potravy cestou aktivace receptorů aferentních nervů (převážně cestou nervu vagu) a stimulují centrum sytosti a inhibují centrum hladu (Konturek et al., 2004). Mezi anorexigenní peptidy patří cholecystokinin (CCK), pankreatický polypeptid (PP), peptid YY a leptin produkovaný tukovou tkání. Bylo zjištěno, že periferní ghrelin snižuje uvolňování leptinu z tukové tkáně a snižuje účinky leptinu, a obráceně, leptin snižuje plazmatické hladiny ghrelu. Předpokládá se, že leptin vykazuje negativní kontraregulační účinky na uvolňování a účinky ghrelu, a že zvýšené hladiny ghrelu navozené hladověním vznikají kvůli slábnoucímu inhibičnímu účinku leptinu a pravděpodobně i PYY. To by mohlo znamenat, že účinky leptinu na snížení tělesné hmotnosti nejsou zprostředkovány pouze jeho přímým působením na hypotalamus, ale také jeho periferním inhibičním účinkem na uvolňování a účinky ghrelu (Konturek et al., 2005).

1.2.1 Ghrelin

1.2.1.1 Struktura a formy ghrelinu

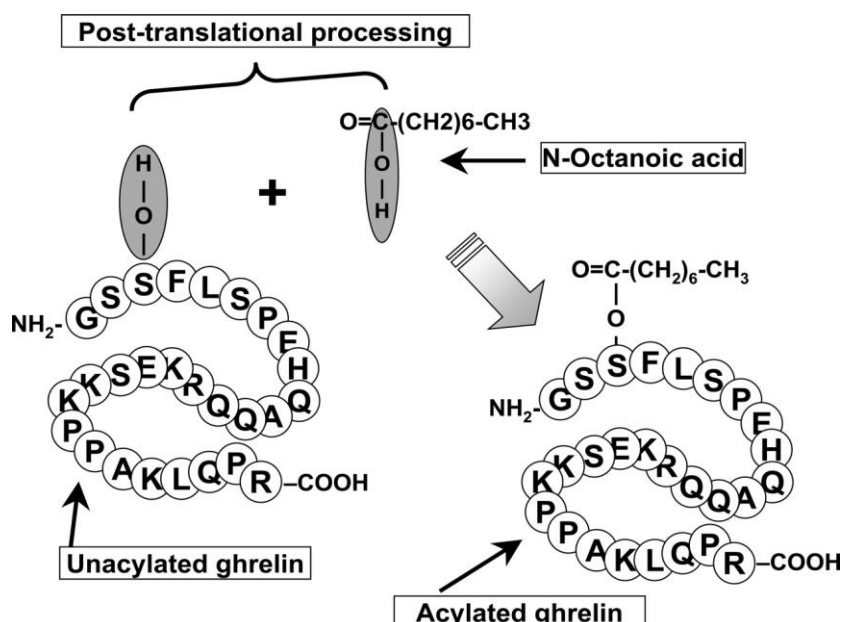
Ghrelin je peptid, který se skládá z 28 aminokyselin a je produkován převážně v žaludku, v menším množství byla jeho exprese potvrzena také v mnoha dalších tkáních (Lely et al. 2004). Ghrelin byl objeven v roce 1999 Kojimou et al. jako přirozený endogenní ligand growth hormone secretagogue receptorů (GHS-R) typu 1a (GHS-R1a) (Kojima et al., 1999; Kojima et al. 2001). Tyto receptory byly před objevem ghrelinu specifické pro rodinu synteticky vytvořených peptidových a nepeptidových molekul (growth hormone secretagogues, GHSs), které stimulují sekreci růstového hormonu u různých druhů živočichů, včetně člověka (Kojima et al. 2001; Lely et al, 2005; Ueno et al., 2005). Ghrelin byl po svém objevu pojmenován podle proto-indo-evropského slova „ghre“, které je kořenem slova „ghrow“ a znamená růst, v souvislosti s tím, že kromě mnoha jiných účinků vykazuje ghrelin vliv na uvolňování růstového hormonu (Kojima et al, 2005; Hosoda et al, 2006). Receptory GHS-R jsou koncentrované zejména v hypothalamu a hypofýze, ale také v dalších centrálních i periferních tkáních (Kojima *et al.* 2001, Muccioli *et al.* 2002; Lely et al. 2004).

Ghrelin byl primárně izolován z žaludku krys a následně i z žaludku člověka, a bylo zjištěno, že lidský a krysí ghrelin jsou kromě dvou aminokyselin identické. Během izolace ghrelinu bylo objeveno několik forem tohoto peptidu, hlavní formy jsou dvě: acylovaná forma ghrelinu – acyl ghrelin a neacylovaná forma ghrelinu – desacyl ghrelin. Acyl ghrelin má unikátní posttranslační úpravu, kdy je hydroxylová skupina na třetím serinovém zbytku (Ser3) esterifikována kyselinou n-oktanovou, a tato acylační úprava je zásadní pro navázání na receptory GHS-R1a a pro biologické účinky ghrelinu, včetně stimulační aktivity ghrelinu na uvolňování růstového hormonu (Lely et al. 2004; Kojima et al., 2005).

Desacyl ghrelin je neaktivní forma ghrelinu, která nemá n-octanoylovou skupinu a vyskytuje se v žaludku i v krevním oběhu ve výrazně vyšším množství, než acyl ghrelin. Neváže se na GHS-R1a receptory a zdá se, že nevykazuje vliv na uvolňování růstového hormonu ani další endokrinní účinky. Dosud nebylo zjištěno, zda existuje specifický receptor pro desacyl ghrelin ani zda desacyl ghrelin má specifické funkce, odlišné od acylghrelinu. Bylo objeveno, že desacyl ghrelin může vykazovat některé neendokrinní účinky včetně kardiovaskulárních a antiproliferačních účinků, pravděpodobně navázáním

na různé podtypy GHS-R receptorů nebo receptorových rodin (Cassoni et al., 2001; Lely et al., 2004; Kojima et al., 2005). Desacyl ghrelin by mohl reprezentovat buď formu ghreluinu, která je později acylována, nebo produkt desacylace acylovaného ghreluinu (Kojima et al., 2005).

V krevním oběhu se vyskytuje současně acyl i desacyl ghrelin, přičemž desacyl ghrelin tvoří téměř 90% z celkového cirkulujícího ghreluinu a má delší poločas rozpadu (Asakawa et al., 2005; Kojima et al., 2005). Obě tyto formy ghreluinu dohromady tvoří total ghrelin neboli celkový ghrelin (Kojima et al., 2005).



Obr. 1 Vznik acyl ghreluinu – esterifikace kyselinou n-oktanovou (Lely et al., 2004)

1.2.1.2 Fyziologické účinky ghreluinu

Ghrelin je největším množstvím produkován v žaludku a v menším množství také ve střevě, slinivce, ledvinách, imunitním systému, placentě, varlatech, plicích, hypofýze a hypothalamu (Lely et al., 2004). V trávicím traktu je ghrelin produkován v oxyntických žlázách, zejména v X/A buňkách, které reprezentují přibližně jednu čtvrtinu endokrinních buněk v oxyntických žlázách v lamina propria. Tyto buňky většinou nemají žádné spojení s lumen žaludku a pravděpodobně odpovídají na fyzikální a/nebo chemické podněty

z basolaterální strany, a jsou umístěny v blízkosti kapilární sítě v lamina propria. Buňky produkující ghrelin jsou umístěny také v duodenu, jejunu, ileu a tračníku, a koncentrace ghreluinu klesá ve střevě směrem od duodena k tračníku (Date et al., 2000; Hosoda et al., 2002). Množství ghreluinu v žaludku je velmi nízké prenatálně a s věkem se zvyšuje (Hayashida et al., 2002). V plasmě se koncentrace ghreluinu postnatálně zvyšují souběžně s množstvím ghreluinu, které produkuje žaludek (Lee et al., 2002).

Ghrelin vykazuje velké množství biologických účinků:

1. Hypotalamo-hypofyzární účinky ghreluinu

Ghrelin působí na uvolňování růstového hormonu, na úrovni hypotalamu pravděpodobně přímo působením na hypofyzární a hypotalamické GHS-R receptory (St-Pierre et al., 2003). Jeho působení je závislé na dávce a projevuje se silněji u lidí než u zvířat (Kojima et al., 1999; Lely et al., 2004). Ghrelin produkovaný v žaludku působí na uvolňování růstového hormonu cestou nervus vagus, zřejmě modulací hypotalamického GHRH (growth hormone releasing hormone). Účinky ghreluinu nejsou specifické jen pro růstový hormon, ale také stimulačně působí sekreci prolaktinu (PRL) a adrenokortikotropního hormonu (ACTH) (Lely et al., 2004).

2. Centrální účinky ghreluinu

a) Vliv ghreluinu na příjem potravy

Příjem potravy je regulován komplexem mechanismů v centrálním nervovém systému, zejména hypotalamem. Odstranění laterálního centra hypotalamu vede u pokusných zvířat k hypofágii a následné smrti, naopak odstranění ventromediálního hypotalamu vede k hyperfágii a obezitě (Kojima et al., 2005). K centrálním mechanismům regulujícím příjem potravy se přidávají další mechanismy zprostředkované sekrecí hormonů z periferních tkání. Sliznice žaludku a střeva produkuje hormon ghrelin, který silně stimuluje příjem potravy (Kojima et al., 2005), tuková tkáň produkuje hormon leptin, který potlačuje příjem potravy a přenáší do mozku signály sytosti (Friedman et al., 2002). Chronické intracerebroventrikulární podávání ghreluinu silně stimulovalo příjem potravy a zvyšovalo tělesnou hmotnost u krys (Kojima et al., 2001, Hosoda et al., 2006). U lidí bylo zjištěno, že injekce nebo infuze tohoto hormonu navozuje hlad (Wren et al., 2001) a

ghrelin je tak první identifikovaný hormon v krevním oběhu, u kterého bylo zjištěno, že podporuje příjem potravy po periferním podání. Na rozdíl od ghreluinu je většina ostatních hypothalamických peptidů, které stimulují příjem potravy, když jsou podány centrálně, neúčinná při periferním podání (např. NPY, AgRP a orexiny) (Lely et al., 2004).

Hladiny ghreluinu v krevním oběhu reagují na akutní i chronickou energetickou nerovnováhu, jsou zvýšené při hladovění a záporné energetické bilanci, jako je anorexie a kachexie, a snižené při obezitě (Ariyasu et al., 2001; Otto et al., 2001; Muccioli et al., 2002; Soriano-Guillen et al., 2004; Ukkola et al., 2005). U zdravých osob se hladiny ghreluinu zvyšují bezprostředně před jídlem a klesají na minimální hodnoty během jedné hodiny po jídle (Cummings et al., 2001; Tschop et al., 2001). Preprandiální zvýšení a postprandiální pokles v hladinách ghreluinu podporuje hypotézu, že ghrelin je iniciačním signálem pro zahájení jídla (Kojima et al., 2005). Injekce ghreluinu stimuluje rychle a přechodně příjem potravy, zejména zvýšením chuti k jídlu a počtem jídel (Cummings, 2006). Otázkou zůstává, co je určujícím faktorem pro pokles hladin ghreluinu po jídle. Může to být buď složení nutrientů v přijaté potravě, (Hosoda et al., 2002; Sanchez et al., 2004; Erdmann et al., 2003; Erdmann et al., 2004), kalorická hodnota přijaté potravy (Krykorková et al., 2003; Cummings et al., 2004; Bloom et al., 2005), nebo samotná přítomnost potravy v žaludku (Nedvídková et al., 2003). Nutrienty se liší podle sytivosti, nejvyšší sytivost mají proteiny, nižší sacharidy a nejnižší tuky (Fisher et al., 2004).

Některé z předchozích studií poukazují na to, že pro uvolňování ghreluinu není podstatné množství a objem konzumovaného jídla, ale spíše obsah nutrientů v jídle obsažených (Tschop et al., 2000; Shiiya et al., 2002; Erdmann et al., 2003). Ve studii Erdmanna et al. (2004) po sacharidovém jídle hladiny plazmatického ghreluinu poklesly, zatímco po jídle obsahujícím tuk, proteiny, ovoce a zeleninu se hladiny ghreluinu zvýšily a nepřímo korelovaly s hladinami inzulinu (Erdmann et al., 2004). Shiiya et al. (2002) uvádějí, že plasmatické hladiny ghreluinu u zdravých osob signifikantně klesají po orálním i intravenózním podání glukózy. Podle Monteleona et al. (2003) je sekrece ghreluinu nejvíce potlačena sacharidy a v nejméně tuky (Monteleone et al., 2003). Samotná distenze žaludku podle některých studií hladiny ghreluinu neovlivňuje, jak bylo zjištěno při testech s vodou (Shiiya et al., 2002), ale naopak Nedvídková et al. (2003) zjistili, že pokles v hladinách ghreluinu vyvolává i konzumace rozpuštěné vlákniny bez kalorické hodnoty. Podle dalších studií je určujícím faktorem kalorická hodnota jídla, kdy po vysokokalorickém jídle se

hladiny ghreluinu vrací na počáteční úroveň výrazně později, než po nekalorickém (Blom et al., 2005), nebo pokles hladin ghreluinu po podání kalorické potravy nastává později než po potravě nekalorické (Krykorková et al., 2003). Podle Arosia et al. (2003) dochází k poklesu hladin ghreluinu i v případě, že je potrava pouze rozžvýkána v ústech a vyplivnuta bez následného polknutí (Arosio et al., 2004). Dosud nebyl zcela objasněn vztah ghreluinu, insulinu a glukózy, podle většiny studií společně s postprandiálním poklesem ghreluinu nastává v hladinách insulinu a glukózy zvýšení (Cummings et al., 2001; Tschop et al., 2001; Shiiya et al., 2002; Erdmann et al., 2004).

b) Vliv ghreluinu na chování a spánek

U myší bylo prokázáno, že kromě regulace jídelního chování ghrelin ovlivňuje úzkostné chování ovlivněním hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osy. Intracerebroventrikulární i intraperitoneální podání ghreluinu navozovalo u myší úzkostné chování (Asakawa et al., 2001). Studie se syntetickými GHSs ukázaly, že podání peptidových GHSs může ovlivnit spánkový režim u zdravých lidí, a u starších lidí prodlužovalo podání molekuly MK-0677 délku REM fáze spánku. U krys bylo prokázáno, že ghrelin ovlivňuje fáze spánku a probuzení (Tolle et al., 2002; Weikel et al., 2003).

3. Periferní účinky ghreluinu

a) Gastro-entero-pankreatické účinky ghreluinu

Bylo zjištěno, že intravenózní podání ghreluinu zvyšuje sekreci žaludečních kyselin a stimuluje žaludeční motilitu a vyprazdňování (Asakawa et al., 2001; Masuda et al., 2000). Ghrelin produkující buňky byly nalezeny i ve slinivce břišní (Hosoda et al., 2006).

b) Kardiovaskulární účinky ghreluinu

Většina studií týkajících se kardiovaskulárních účinků ghreluinu byla provedena na hlodavcích, kde ghrelin vykazoval příznivé účinky na kardiovaskulární systém. U lidí bylo zjištěno, že intravenózní podání ghreluinu snižuje arteriální tlak beze změny srdeční frekvence (Nagaya et al., 2001).

c) Účinky ghreluinu na proliferaci neoplastických buněk

V normální i neoplastické tkáni štítné žlázy se nacházejí specifická vazebná místa pro peptidové i nepeptidové GHS molekuly. Buňky v medulárních, ale ne folikulárních karcinomech štítné žlázy exprimují ghrelin. Bylo zjištěno, že ghrelin a peptidové i nepeptidové GHS molekuly inhibují inkorporaci [^3H] thymidinu a buněčnou proliferaci ve všech typech nádorů štítné žlázy (Kanamoto et al, 2001). Stejně účinky vykazují i v estrogen-dependentních a estrogen-independentních nádorech prsu, a vazebná místa pro GHS molekuly byla nalezena i v adenokarcinomech plic. Stejně účinky jako acyl ghrelin vykazuje při působení v nádorech i desacyl ghrelin, což napovídá, že desacyl ghrelin je biologicky účinný přinejmenším při antiproliferativním působení (Cassoni et al, 2001).

Je tedy velmi pravděpodobné, že ghrelin a jeho GHS analogy, účinkující buď jako agonisté nebo antagonisté při různých fyziologických a patofyziologických procesech, mohou mít různý klinický vliv a terapeutický potenciál (Lely et al, 2005).

1.2.1.3 Ghrelin a poruchy příjmu potravy

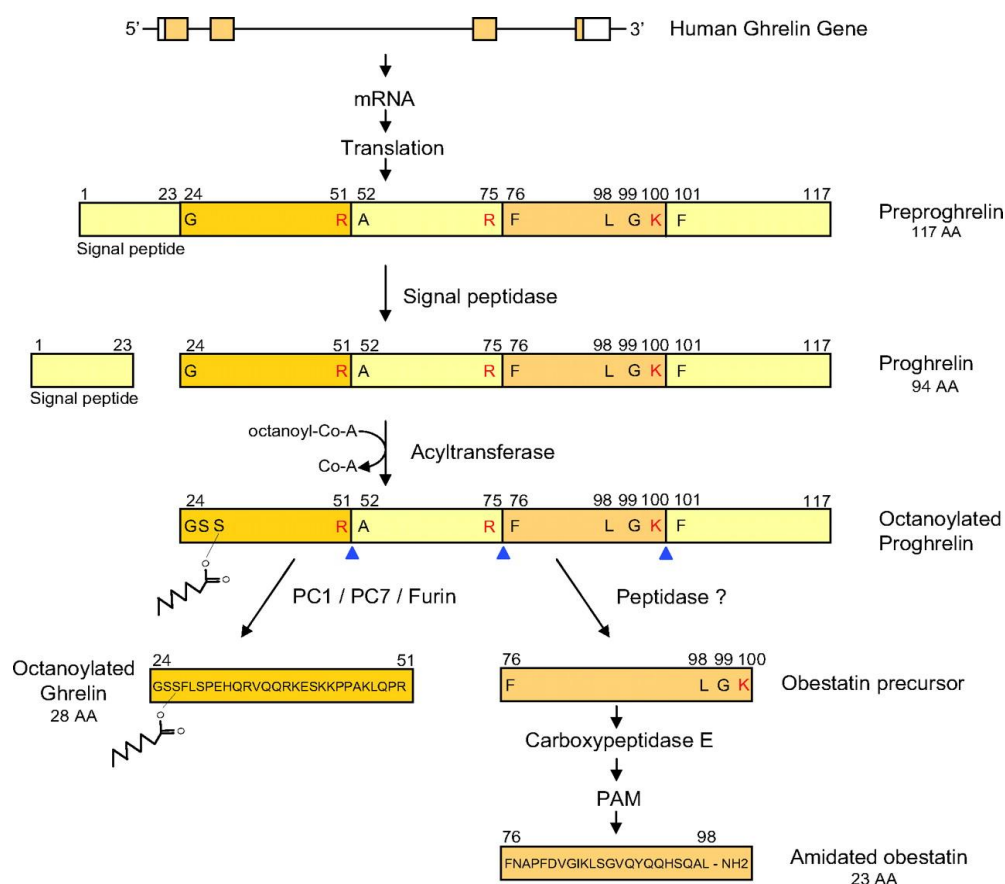
U pacientek s AN jsou plazmatické hladiny ghreluinu chronicky vysoké a vrací se na normální úroveň po léčbě spojené s váhovým příbytkem (Ariyasu et al., 2001; Otto et al, 2001; Tanaka et al., 2003; Nedvídková et al, 2003; Nakahara et al. 2007). Zvýšení v hladinách ghreluinu u pacientek s AN je pravděpodobně kompenzačním mechanismem pro zvýšení kalorického příjmu a navození stavu pozitivní energetické rovnováhy. Hladiny ghreluinu ovlivňuje BMI a jídelní chování pacientek, kdy u purgativní formy anorexie s epizodami přejídání a zvracení byly zjištěny hladiny ghreluinu vyšší, než u restriktivní formy (Tanaka et al., 2003; Troisi et al, 2005; Janas-Kozik et al., 2007). Postprandiální změny ghreluinu u pacientek s AN zkoumalo několik studií s rozporupnými výsledky. Ve studii Nedvídkové et al. (2003) zůstaly plazmatické hladiny ghreluinu po konzumaci standardní snídaně u pacientek s AN nezměněné. Naopak ve studiích Otty et al. (2005) a Nakahary et al. (2007) plazmatické hladiny ghreluinu po konzumaci standardního jídla, tekutého i pevného, poklesly.

U pacientek s BN většina studií uvádí normální bazální hladiny ghreluinu (Monteleone et al, 2005; Roauch et al., 2007; Monteleone et al., 2008), pouze v několika studiích byly hladiny ghreluinu u těchto pacientek naměřeny zvýšené (Tanaka et al., 2002; Kojima et al., 2005).

1.2.2 Obestatin

1.2.2.1 Struktura obestatinu

Obestatin je peptid, který se skládá z 23 aminokyselin a je odvozen ze stejného genu jako ghrelin. Po odštěpení z proghrelinu je obestatin na svém C-terminálním konci amidován aminoskupinou, a tato amidace je nezbytná pro jeho biologickou aktivitu (Germain et al., 2009). Obestatin byl objeven v roce 2005 Zhangem et al. (Zhang et al., 2005) v žaludku krys. Tito autoři ho popsali nejdříve jako peptid aktivující G-proteinový receptor GPR-39, další studie však schopnost obestatinu vázat se na tento receptor nepotvrdily, přestože autoři používali stejné výchozí podmínky, jaké popsali Zhang et al. (2005) (Holst et al. 2007, Tremblay et al. 2007).



Obr. 2 Vznik ghrelinu a obestatinu (Garg et al, 2007)

1.2.2.2 Fyziologické účinky obestatinu

Zhang et al. (2005) popsali původně vliv obestatinu na potlačení příjmu potravy u hladovějících/krmených myši, a prezentovali ho jako hormon, který má antagonistické funkce k účinkům ghreluinu při působení na energetickou rovnováhu a gastrointestinální trakt (Zhang et al., 2005; Seoane et al., 2006; Gourcerol et al., 2007). Dále autoři popsali vliv obestatinu na zpomalování žaludečního vyprazdňování a zpomalování kontrakcí jejunu (Zhang et al., 2005). Většina následujících studií však nemohla anorexigenní účinky obestatinu potvrdit (Gourcerol et al. 2006, Samson et al. 2007, Holst et al. 2007, Nogueiras et al. 2007, Zizzari et al. 2007), s výjimkou dvou (Tremblay et al. 2007, Carlini et al. 2007). V následujících studiích byly popsány účinky obestatinu na proliferaci buněk lidské sítnice, účinky na paměť a vyvolávání úzkosti, centrální účinky na inhibici žízně a ovlivnění spánku u krys (Lagaud et al, 2007). Úloha obestatinu tak zůstává stále sporná – zda působí jako kontraregulátor ghreluinu, nebo jako orexigenní hormon, fungující podobným způsobem jako ghrelin (Chartrel et al.; 2007). Bang et al. (2007) ve své studii nenalezli žádný důkaz existence obestatinu jako unikátního endogenního peptidu a data z této studie spíše naznačují, že cirkulující i zásobní peptidy, odvozené od karboxylového konce proghreluinu (C-ghrelin) odpovídají délkou proghreluinu (29-94) a reagují na metabolické změny podobným způsobem jako ghrelin (1-28), přinejmenším u lidí.

2.2.3 Obestatin a poruchy příjmu potravy

Hladiny obestatinu v krevním oběhu byly nalezeny vyšší u žen než u mužů, a nízké u obézních dospělých osob i u obézních dětí (Guo et al., 2007; Gao et al., 2008). U pacientek s AN byly nalezeny vysoké hladiny obestatinu v několika studiích (Harada et al., 2008; Nakahara et al., 2008; Germain et al, 2009). Poměr ghreluinu k obestatinu, který by mohl vypovídat o vzájemném účinku těchto dvou hormonů, byl nalezen zvýšený u obézních osob a snížený u pacientek s AN (Guo et al., 2007; Germain et al., 2009; Monteleone et al., 2008). Ve studii Nakahary et al. (2008) plazmatické hladiny obestatinu pozitivně korelovaly s hladinami acylghreluinu a desacylghreluinu a negativně s hladinami glukózy, inzulinu a BMI. Monteleone et al. (2008) nenalezli žádné změny v hladinách obestatinu ani ghreluinu u pacientek s BN. Vztahy mezi ghrelinem a obestatinem při regulaci příjmu potravy tak zatím zůstávají neobjasněné (Seoane et al. 2006, Nogueiras et

al. 2007), ale preprandiální poměr ghrelinu k obestatinu může mít důležitou úlohu v etiologii a patofyziologii obezity i AN (Guo *et al.* 2007; Germain *et al.*, 2009).

1.2.3 Neuropeptid Y

1.2.3.1. Struktura neuropeptidu Y (NPY)

Neuropeptid Y je peptid, který se skládá ze 36 aminokyselin a patří do rodiny pankreatických polypeptidů. Je to jeden z nejčastěji se vyskytujících peptidů v mozku, a vyskytuje se i v periferním nervovém systému. NPY byl objeven v roce 1982 Tatemoto *et Muttem* a jeho jméno je odvozeno od kódu aminokyseliny tyrosin (Y), protože obsahuje několik tyrosinových zbytků, včetně tyrosinového zbytku na C-terminálním konci. NPY se v mozku vyskytuje v mozkové kůře, hipokampu, zadním mozku a hypotalamu. V hypotalamu je syntetizováno asi 40 % NPY neurony v ARC (Hillebrand *et al.*, 2002). Tyto neurony syntetizují současně i jiný orexigenní peptid – agouti-related peptide (AgRP), a vysílají své axony směrem k nucleus paraventricularis (PVN) a nucleus dorsomedialis (DMN). PVN také přijímá axony z neuronů syntetizujících NPY, přítomných v mozkovém kmeni. Biologické účinky NPY jsou zprostředkovány šesti receptory spáženými s G-proteiny, pojmenovanými Y1-Y6 (receptor Y6 je inaktivní u primátů). Největší afinitu má NPY k receptorům Y1 a Y5, které zprostředkovávají jeho orexigenní účinky (Larhammar *et al.*, 1996; Inui *et al.*, 1999).

1.2.3.2. Fyziologické účinky neuropeptidu Y

Distribuce NPY je spojena s různými biologickými účinky, včetně regulace příjmu potravy, kardiovaskulárního systému, stresu, kognice a modulace neuroendokrinního systému (Beck *et al.*, 2006). U krys injekce NPY do mozku, buď do mozkových komor, nebo různých hypotalamických jader vyvolává silné zvýšení příjmu potravy (Clark *et al.*, 1984). Centrálně podaný NPY ovlivňuje kromě množství potravy také kvalitativní složku jídla, kdy krysy při více možnostech výběru preferují sacharidy před proteiny i tuky (Stanley *et al.*, 1985; Stanley *et al.*, 1989). Preference sacharidů ve složení potravy souvisí zejména s množstvím NPY v PVN, a sacharidy tedy zřejmě mají určitou úlohu při orexigenních účincích NPY (Glass *et al.*, 1997). Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje

hypotalamické hladiny NPY, je potravní deprivace a s ní související záporná energetická bilance. Při akutním i chronickém nedostatku potravy se výrazně zvýší exprese NPY v ARC, při chronickém nedostatku se zvýší exprese NPY také v zadním mozku. Paralelní zvýšení NPY bylo nalezeno při hladovění i v PVN, jak bylo prokázáno ve studiích na krysách. Po příjmu potravy a zvýšení hmotnosti se hladiny NPY v ARC vrací rychle na normální úroveň, v PVN je tento návrat pomalejší (Beck et al., 2006). V ARC jsou přítomné i receptory pro leptin, a při hladovění vede snížení exprese leptinu v tukové tkáni i jeho hladin v plasmě ke zvýšené regulaci systému NPY, kdy se zvýší exprese mRNA a produkce NPY v ARC a ve zvýšené míře se začne uvolňovat NPY v PVN (Sainsbury et al., 1996). Systém NPY interaguje s dalšími orexigenními systémy v těle, které zahrnují systém orexinů, glukokortikoidů a ghrelinu, aby byl schopen přizpůsobit jídelní chování individuálním potřebám a situacím (Beck et al., 2006).

1.2.3.3 NPY a poruchy příjmu potravy

Studie in vivo ukázaly, že NPY uvolňované z PVN se zvyšuje během hladovění a klesá po příjmu potravy (Kalra et al., 1991). U pacientek s AN byly zjištěny zvýšené hladiny NPY v mozkomíšním moku (Kaye et al., 1990). Plazmatické hladiny NPY u těchto pacientek byly v některých studiích nalezeny zvýšené (Escobar et al., 2002; Oświecimska et al., 2005), v jiných snižené (Baranowska et al., 2001). Zvýšené hladiny NPY však nemají za následek zvýšení příjmu potravy u pacientek s AN. Hladiny NPY u pacientek s BN byly nalezeny normální (Gendall et al., 1999) nebo zvýšené (Baranowska et al., 2001).

1.2.4 Peptid YY (PYY)

1.2.4.1. Struktura a formy peptidu YY

Peptid YY je krátkodobý regulátor příjmu potravy, který se skládá z 36 aminokyselin a je produkován endokrinními L-buňkami sliznice tenkého a tlustého střeva (Monteleone et al., 2008). Poprvé byl izolován v roce 1980 ze střeva prasete a jeho jméno je odvozeno od aminokyselin tyrosinu (Y), které jsou na jeho N-terminálním i C-terminálním konci. PYY patří do rodiny peptidů, která zahrnuje neuropeptid Y a pankreatický polypeptid (PP), a je s nimi přibližně v 70 % struktury homologní. Všechny 3

peptidy mají stejnou terciární strukturu, která definuje tvar písmene U s prodlouženým polyprolinovým helixem a α helixem spojeným s β smyčkou. PYY je uvolňován do krevního oběhu ve dvou formách, jako PYY1-36 a PYY3-36. Hlavní forma v endokrinních buňkách střeva i v krevním oběhu je PYY3-36, která je tvořena odštěpením dvou aminokyselin od N-terminálního konce dipeptidylovou peptidázou (Ueno et al., 2008). Receptory pro PYY jsou receptory spřažené s G-proteinem a pět těchto Y receptorů zprostředkovává účinky peptidů PYY, NPY a PP. PYY1-36 se váže na všech pět receptorů (Y1, Y2, Y4, Y5 a Y6), PYY3-36 se váže s velkou afinitou na Y2 receptor a s mírnou afinitou na Y1 a Y5. Receptory Y2 jsou distribuovány v oblasti hypotalamu, zejména v nucleus arcuatus, a stejně tak v hipokampu, střevě a neuronech ganglium nodosum (Ueno et al., 2008).

1.2.4.2 Fyziologické účinky peptidu YY

PYY je produkován zejména v ileu a tlustém střevě, kde jsou povrchové mikrokylky L-buněk v kontaktu s lumen střeva, což těmto buňkám umožňuje vnímat nutrienty a látky přítomné ve střevě. Koncentrace PYY ve střevě stoupá směrem od ilea k rektu, kde je nejvyšší (Adrian et al., 1985). Sekrece PYY je stimulována neuronálními a humorálními faktory, stejně jako obsahem nutrientů ve střevě. Plazmatické hladiny PYY jsou nízké při hladovění a postprandiálně se rychle zvyšují během 15 min po zahájení jídla, maximálních hodnot dosahují přibližně během 1,5–2 hod a zůstávají zvýšené asi 6 hodin (Kaye et al., 1990; Druce et al., 2004; Monteleone et al., 2008). Preprandiální pokles a postprandiální zvýšení v plazmatických hladinách PYY tak napovídá, že PYY je signál sytosti (Ueno et al., 2008). Předpokládá se, že PYY3-36 primárně inhibuje příjem potravy přes receptor Y2 omezením sekrece NPY v nucleus arcuatus. V nedávné době Koda et al. (2005) uvedli, že hlavní cesta pro přenos signálů sytosti prostřednictvím PYY3-36 je přes aferentní systém nervu vagu. Podle výsledků jejich studie se zdá, že periferní PYY3-36 se váže na Y2 receptory v terminální části tohoto systému a aferentní cestou jsou přenášeny signály sytosti do mozku. Tato teorie je podpořena i tím, že u krys potrava dodaná přímo do duodena zvyšuje plazmatické hladiny PYY dříve, než se nutrienty dostanou k PYY produkujícím buňkám v ileu nebo tračníku, což svědčí o uvolňování PYY cestou nervového reflexu (Ueno et al., 2008).

Mezi další účinky fyziologické účinky PYY patří inhibice motility jejunu a tračníku, a vasokonstrikce střev. Intravenózní infuze PYY u lidí zpomaluje vyprazdňování žaludku a pohyb potravy do caecum a také zvyšuje systolický i diastolický krevní tlak (Adrian et al., 1985). Sekrece PYY je kromě nutrientů stimulována žlučí, žaludečními kyselinami a cholecystokininem (Ueno et al., 2008).

1.2.4.3 Peptid YY a poruchy příjmu potravy

Ve studii Batterhama et al. (2003) byla infuze PYY3-36 po určité době hladovění schopná snížit příjem potravy o více než třetinu u štíhlých i obézních osob na dobu 24 hodin, a také snížit hladiny ghrelinu v krevním oběhu. Zdá se tedy, že periferní PYY3-36 funguje jako signál sytosti regulující ukončení jednotlivých jídel, zčásti snížením produkce hlad stimulačního peptidu ghrelinu (Monteleone et al., 2008). U lidí bylo zjištěno, že plazmatické hodnoty PYY jsou vyšší po konzumaci jídla s vysokým obsahem proteinů, než po izokalorickém jídle s vysokým obsahem tuků nebo sacharidů (Batterham et al., 2006).

Dosud malý počet studií zkoumal uvolňování PYY3-36 u pacientů s poruchami příjmu potravy. U obézních pacientů jsou hladiny PYY nižší ve srovnání se zdravými subjekty a hladiny PYY korelují záporně s BMI (Batterham et al., 2003). U pacientek s AN byly hladiny PYY nalezeny normální a odpověď PYY na příjem potravy zpožděná (Stock et al., 2005), naopak jiné studie udávají zvýšené hladiny PYY i zvýšenou odpověď na příjem potravy (Nakahara et al., 2007; Misra et al., 2006). V další studii, zkoumající vliv epizod přejedení a zvracení bylo zjištěno, že u zdravých žen se plazmatické hladiny PYY významně zvýšily po jídle a zůstaly zvýšené 2 hodiny, zatímco u pacientek s BN se hladiny PYY zvýšily po první epizodě přejedení a zůstaly zvýšené během následujících epizod přejídání a zvracení, přičemž měly pacientky s BN mírně vyšší postprandiální maximální hodnotu PYY, než zdravé ženy (Kaye et al., 1990; Monteleone et al., 2008). V současné době zjistily dvě nezávislé studie u pacientek s AN narušenou odpověď PYY3-36 po konzumaci jídla, současně se sníženou odpovědí ghrelinu (Monteleone et al., 2005; Kojima et al., 2005). Obě studie ukázaly negativní korelaci mezi PYY3-36 a ghrelinem. Potlačení ghrelinu a zvýšení plazmatického PYY3-36 po konzumaci potravy může znamenat kompenzační spuštění periferních signálů zaměřených na podporu ukončení příjmu potravy (Monteleone et al., 2008).

1.2.5 Leptin

1.2.5.1 Struktura leptinu

Leptin je protein, tvořený 167 aminokyselinami, který je produkován převážně adipocyty v tukové tkáni, v malém množství i v dalších tkáních. Byl objeven v roce 1995 Friedmanem et al. po identifikaci *ob*-genu odpovědného za obezitu u *ob/ob* myši (Halaas et al., 1995). Leptin je syntetizován v bílé i hnědé tukové tkáni, a byl objeven jako první hormon produkován adipocyty, což prokázalo jejich důležitou úlohu v metabolické signalizaci (Engineer at el., 2012). Hlavní úlohou leptinu je regulace tělesné hmotnosti, a proto byl pojmenován podle řeckého slova *leptos*, které znamená štíhlý. Struktura leptinu je tvořena čtyřmi α -helixy, spojenými jedním dlouhým a dvěma krátkými spoji (Zhang et al., 1994). Leptin z tukové tkáně je uvolňován přímo do krve a krevním oběhem se dostává do hypotalamu, kde se váže na leptinové receptory. Ty pak přes další mechanismy stimulují anorexigenní dráhy a aktivují neurony uvolňující α -MSH a CART, a také inhibují orexigenní dráhy snížením exprese mRNA NPY a AgRP (Cowley et al. 2001). Receptory pro leptin se vyskytují centrálně v hypotalamu a hypofýze a periferně v žaludku, pankreasu, játrech, ledvinách, plicích a kostní dřeni, vaječnících a varlatech (Engineer at el., 2012).

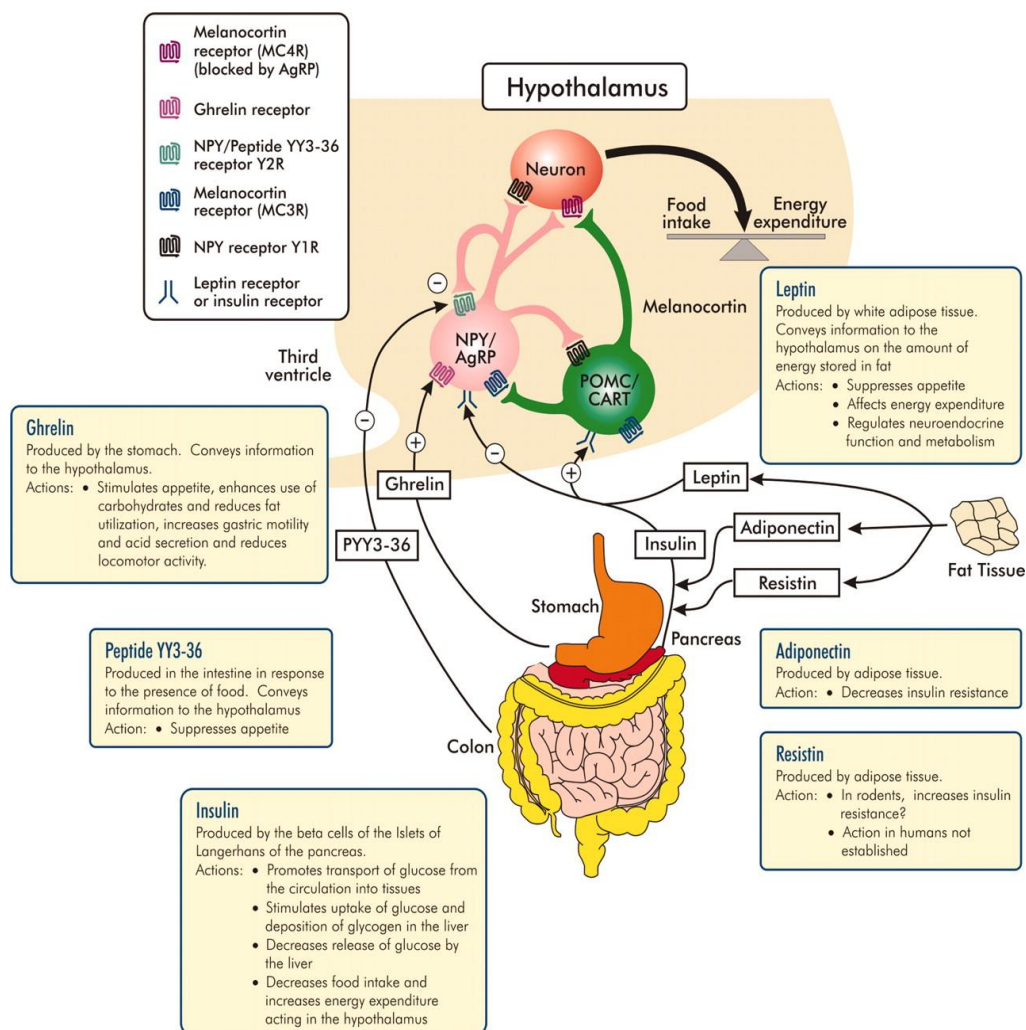
1.2.5.2 Fyziologické účinky leptinu

Hlavní úlohou leptinu je regulace tělesné hmotnosti, kdy leptin informuje mozek o stavu tukových zásob na periférii organismu, stimuluje energetický výdej a snižuje příjem potravy (Engineer at el., 2012). Kromě této hlavní úlohy leptin ovlivňuje různé metabolické dráhy, včetně dráhy růstového hormonu, inzulinové senzitivity a lipogeneze. Uvolňování leptinu je regulováno inzulinem, glukokortikoidy a katecholaminy. Inaktivace leptinu nebo leptinového receptoru vede k chybnému vnímání hladovění a následné hyperfagii, poklesu energetického výdeje a těžké obezitě. V případě, že je obezita navozená jídelním chováním a mutace v leptinovém genu ani receptoru nejsou přítomné, vzrůst tukové tkáně vede ke zvýšení hladin leptinu (Engineer at el., 2012). Podle studie Considine at al. (1996) zvýšení tělesné hmotnosti o 10 % může vést ke zvýšení hladin

leptinu v séru až o 300 %. Zvýšené hladiny leptinu by měly vést ke snížení příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje fyzickou aktivitou a termogenezí, avšak u obézních lidí vysoké hladiny leptinu nemají za následek předpokládané snížení chuti k jídlu. Původně se předpokládalo, že je to kvůli leptinové rezistenci, kdy dochází k inhibici signálních drah leptinu k neuronům vnímavým k leptinu, defektům leptinových receptorů a omezené transportní kapacitě hematoencefalické bariéry pro leptin. V současné době se však uvažuje o tom, že mechanismem by mohla být spíše nedostatečná činnost centrálního leptinu (Engineer et al., 2012). Dále se leptin účastní angiogeneze, proliferace a diferenciace hematopoetických buněk, hojení ran a má vliv i na imunitní systém (Lu et al., 2000; Margetic et al., 2002). Hladiny leptinu jsou závislé na pohlaví a na zastoupení pohlavních hormonů, ženy mají signifikantně vyšší hladiny leptinu než muži (Mantzoros et al., 1988). Produkce leptinu je diurnální, s nejvyššími hodnotami mezi půlnocí a časnými ranními hodinami, a s nejnižšími hodnotami časně odpoledne mezi 12–15 hodinou. U stavů chronické podvýživy dochází k potlačení tohoto diurnálního rytmu (Saladin et al., 1995; Casanueva et al., 1997).

1.2.5.3. Leptin a poruchy příjmu potravy

Při snížení kalorického příjmu se u lidí snižují hladiny leptinu v séru a při zvýšení kalorického příjmu se hladiny leptinu zvyšují. Zvýšení leptinu lze navodit také podáváním inzulinu, který dává signál ke zvýšení produkce leptinu v tukové tkáni, i když tento účinek inzulinu není okamžitý, ale nastává s určitým časovým odstupem, a to nejméně po 24 hodinách (Saladin et al., 1995; Kolaczynski et al., 1996). Plazmatické hladiny leptinu jsou výrazně sniženy u stavů chronické podvýživy, jako je anorexie a kachexie, což souvisí u těchto onemocnění s výrazným úbytkem tukové tkáně syntetizující leptin (Monteleone et al. 2004; Hebebrand et al. 2007). U pacientek s AN se po nutriční léčbě a s ní souvisejícím váhovým příbytkem hladiny leptinu zvyšují (Haluzík et al., 1999; Svobodová et al., 1999; Bronský et al., 2004; Bronský et al., 2011). U pacientek s BN byly ve většině studií nalezeny hladiny leptinu snižené (Brewerton et al., 2000; Monteleone et al., 2000; Jimerson et al., 2010) a po nutriční léčbě se zvýšily (Monteleone et al., 2000).



Obr. 3 Vztahy mezi periferními orgány a mozkem – interakce v regulaci energetické homeostázy (Gale et al., 2004)

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo:

1. Porovnat bazální plazmatické hladiny hormonů účastnících se příjmu potravy a regulace energetické rovnováhy u pacientek s anorexia nervosa, bulimia nervosa a zdravých žen.
2. Porovnat změny v plazmatických hladinách hormonů příjmu potravy u pacientek s anorexia nervosa a bulimia nervosa po konzumaci sacharidové snídani s údaji zdravých žen.
3. Porovnat změny v plazmatických hladinách ghrelinu, obestatinu, neuropeptidu Y a peptidu YY u pacientek s anorexia nervosa a bulimia nervosa po konzumaci potravy s různým obsahem nutrientů – sacharidové a proteinové snídani s hodnotami zdravých žen i vzájemně mezi skupinami pacientek.
4. Zjistit, zda a jakým způsobem se liší hladiny sledovaných hormonů a jejich odpovědi na konzumaci potravy u pacientek s poruchami příjmu potravy oproti zdravým ženám a přispět tak k poznání narušené regulace příjmu potravy u pacientek s anorexia nervosa a bulimia nervosa.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Studované soubory

V rámci výzkumu, který byl součástí rozsáhlejšího grantového projektu, jsme sledovali tři skupiny žen – pacientky s anorexia nervosa, pacientky s bulimia nervosa a zdravé kontrolní ženy.

Pacientky s anorexia nervosa a bulimia nervosa byly diagnostikovány podle DSM-IV (4th edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 1994) a byly ve věkovém rozmezí 18-30 let. Pacientky byly hospitalizovány na Psychiatrické klinice Univerzity Karlovy, 1. Lékařská fakulta, oddělení Poruch příjmu potravy. Celkem bylo do výzkumu zahrnuto 19 pacientek s AN a 15 pacientek s BN, a pacientky byly kromě onemocnění poruchou příjmu potravy v relativně dobrém zdravotním stavu. Pacientky s AN byly restriktivního i purgativního typu (11 pacientek restriktivních, 8 purgativních) a všechny měly amenoreu. Pacientky s BN měly amenoreu nebo nepravidelný menstruační cyklus.

Kontrolní soubor tvořilo 14 zdravých žen ve věkovém rozmezí 18-30 let. Tyto ženy netrpěly žádnými závažnými onemocněními, jako je diabetes mellitus, onemocnění štítné žlázy, kardiovaskulární onemocnění, onemocnění jater nebo urogenitální soustavy. V minulosti tyto ženy neprodělaly žádné psychiatrické onemocnění spojené s úbytkem tělesné hmotnosti. Všechny ženy měly pravidelný menstruační cyklus.

Výzkum byl rozdělen do několika částí, a podle časové posloupnosti náběrů pacientek i zdravých žen se měnilo složení sledovaných souborů:

Studie I: Bazální plazmatické hladiny hormonů u pacientek s AN na počátku a konci šestitýdenní léčby

Do této studie bylo zahrnuto 10 pacientek s AN restriktivního typu (věk $23,3 \pm 1,0$; BMI $14,74 \pm 0,43$) a 10 zdravých žen (věk $24,3 \pm 0,8$; BMI $21,45 \pm 0,72$).

Studie II: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové snídani u zdravých žen

Do této studie bylo zahrnuto 8 zdravých žen (věk $24,2 \pm 0,82$; BMI $21,6 \pm 0,61$).

Studie III: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové snídani u pacientek s AN a BN

Do této studie bylo zahrnuto 8 pacientek s AN (věk $25,4 \pm 1,9$; BMI $15,8 \pm 0,5$), 13 pacientek s BN (věk $22,0 \pm 1,05$, BMI $20,1 \pm 0,41$) a 11 zdravých žen (věk $25,1 \pm 1,16$, BMI $20,9 \pm 0,40$).

5 pacientek s AN bylo restriktivního typu, 3 pacientky purgativního typu.

Studie IV: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové a proteinové snídani u pacientek s AN a BN

Této studie se účastnilo celkem 14 pacientek s AN (věk: $24,6 \pm 1,8$, BMI: $15,3 \pm 0,7$), 15 pacientek s BN (věk: $23,2 \pm 1,7$ years, BMI: $20,5 \pm 0,9$) a 14 zdravých žen ($24,9 \pm 1,4$ years, BMI: $21,1 \pm 0,8$).

8 pacientek s AN bylo restriktivního typu, 6 pacientek purgativního typu.

3.2 Průběh studie

Před zahájením studií podepsaly všechny pacientky i zdravé ženy informovaný souhlas s účastí ve studii, která byla schválena Etickou komisí Endokrinologického ústavu.

3.2.1 Studie I: Bazální plazmatické hladiny hormonů u pacientek s AN na počátku a konci šestitýdenní léčby

Tato studie sestávala z jednorázových odběrů krve. V den odběru krve bylo provedeno základní lékařské vyšetření a změřena tělesná výška a hmotnost pacientek i zdravých žen. Krev byla odebírána ráno v 7.30 hod, nalačno po celonočním půstu, z kubitální žíly. Zdravým ženám byla krev odebrána jednou, pacientkám s AN dvakrát,

poprvé na počátku hospitalizace (1-2 týdny po zahájení léčby) a podruhé po šesti týdnech léčby.

3.2.2. Studie II–IV: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové a proteinové snídaně u pacientek s AN, BN a zdravých žen

Jídelní testy, při kterých byla ženám zahrnutým do studie podávána sacharidová nebo proteinová snídaně, probíhaly v Endokrinologickém ústavu. Jeden den před testem nesměly účastnice pít a jíst vše, co obsahuje kofein – kávu, černý čaj, nesměly pít alkohol, jíst výrobky s kakaem, banány, ořechy a nesměly užívat léčiva obsahující kyselinu acetylsalicylovou. V den testu absolvovaly ženy vstupní pohovor s lékařem (osobní anamnézu) a základní lékařské vyšetření (měření krevního tlaku a pulzu, výšky, hmotnosti, procenta tělesného tuku bioimpedancí a byla jim stanovena glykémie). Test probíhal vleže na lůžku a účastnice byly informovány o tom, že v průběhu testu nesmí jíst, pít, spát ani opouštět lůžko.

Jídelní test začínal v 7.30 hod ráno, trval přibližně tři a půl hodiny a po celou dobu testu byl celkový stav žen sledován lékařem. Účastnicím byla vleže na lůžku zavedena do kubitální žíly kanyla pro odběr krve. První odběr krve byl prováděn nalačno (0 min) a po něm byla podána snídaně, na jejíž konzumaci měly účastnice 15 minut. Po ukončení snídaně následovaly další odběry krve po 30 minutách, celkem tedy byly nabrána krev v časech 0, 30, 60, 90, 120 a 150 min. Množství krve nabírané v jednotlivých časech se lišilo podle hormonů stanovovaných v daném čase. Po ukončení testu byla účastnicím změřena glykémie, vyjmuta kanyla a jejich zdravotní stav byl zkontrolován lékařem. Po ukončení testu dostaly pacientky občerstvení.

Týden po prvním jídelním testu následoval druhý test, se stejným průběhem. Při prvním testu byla účastnicím podávána sacharidová snídaně, při druhém testu proteinová.

Složení snídání:

1) Sacharidová snídaně – 1604 kJ

jahodová marmeláda 50 g

rohlík 2 ks 90 g

celková hmotnost potravy 140 g

složení: 81,9 g sacharidů, 8,8 g proteinů, 3,4 g tuků

2) Proteinová snídaně – 1350 kJ

cottage sýr 150 g

kuřecí šunka 75 g

racio chlebiček 2 ks 15 g

celková hmotnost potravy 240 g

složení: 41,3 g proteinů, 16,3 g sacharidů, 8,1 g tuků

Obr. 4 Protokol pro odběr krve

Protokol pro odběr krve
(studie REALIMENTACE)

Datum

Značka pacienta

Jméno a příjmení

Rodné číslo

Diagnóza

1. 0 min – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

3 x fialová zkumavka 3 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

SNÍDANĚ – 15 minut

2. 30 min (30 min po ukončení snídaně) – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

1 x fialová zkumavka 3 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

3. 60 min – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

2 x fialová zkumavka 3 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

4. 90 min – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

2 x fialová zkumavka 3 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

5. 120 min – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

2 x fialová zkumavka 3 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

6. 150 min – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

3 x fialová zkumavka 3 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

3.3 Metody stanovení hormonů

3.3.1 Zpracování odebrané krve

Krev byla odebírána do dvou typů zkumavek, jeden typ obsahoval Na₂EDTU a aprotinin, druhý K₂EDTU. Do zkumavky s aprotininem byl po odběru krve přidán inhibitor DPP-IV, v množství 10 μl/1 ml krve. Ihned po odběru krve byly zkumavky uloženy do ledové tříště. Následně byla krev centrifugována 20 min při 3000 otáčkách za minutu a 4 °C. Získaná plazma byla rozpipetována v množství požadovaném pro stanovení jednotlivých hormonů, do zkumavek s plazmou určenou pro stanovení acyl a desacyl ghrelinu byla přidána 1N HCL v množství 10 μl/100 μl plasmy. Potom byla plazma zmrazena při -30 nebo -70 °C.

3.3.2 Stanovení hormonů metodou RIA

Metodou radioimunologické analýzy (radioimmunoassay, RIA) byly stanoveny plazmatické hladiny hormonů ghrelinu, obestatinu, NPY, PYY a leptinu s využitím komerčně dostupných kitů.

Metoda RIA je specifická technika, která využívá radioizotopů k detekci antigenů nebo protilátek v biologických tekutinách, a je založena na kompetitivní vazebné reakci. Jako radioaktivní značka se nejčastěji používá izotop ¹²⁵I, který vykazuje gama záření. Technika stanovení používá tři základní složky: antigen, který stanovujeme, značený antigen s navázaným radioaktivním izotopem a protilátku specifickou pro antigen, který stanovujeme. Oba antigeny spolu spolu kompetují o vazebná místa protilátky, které je omezené množství. Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů antigen-protilátka (se značeným a neznačeným antigenem). Množství značeného komplexu je nepřímo úměrné původnímu množství stanovovaného antigenu. To znamená, že když se množství hormonu v neznámém vzorku zvyšuje, množství antigenu značeného ¹²⁵I schopného navázat se na protilátku se snižuje. Měřením množství ¹²⁵I-značeného hormonu jako funkce koncentrace hormonu ve standardní reakční směsi je možné vytvořit standardní křivku, ze které se určuje koncentrace hormonu v neznámém vzorku.

Vzorky byly měřeny pomocí gama měřiče Berthold Multi-Crystal counter LB2104 (Berthold Technologies, Německo). Radioaktivita je zde měřena jako počet impulzů za minutu (counts per minute, cpm) a impulzy jsou následně pomocí kalibrační závislosti převedeny na koncentraci sledované látky.

3.3.2.1 Stanovení total ghrelinu

Pro stanovení total ghrelinu byl použit Ghrelin (Total) RIA Kit (Linco Research, Inc., USA). Kit obsahuje dostatečné množství činidel pro použití pro 125 RIA zkumavek, stanovení je tří denní.

Dodávaná činidla:

1. Ghrelin (Total) Assay Buffer – ředící roztok, připravený k použití, 20 ml
2. Ghrelin (Total) Antibody – králičí protilátka specifická pro ghrelin, připravená k použití, 13 ml
3. ^{125}I -Ghrelin – izotopově značený ghrelin, lyofilizovaný, po rekonstituci 13,5 ml (obsahuje $< 1,5 \mu\text{Ci}$ (56 kBq))
4. Ghrelin (Total) Label Hydrating Buffer – ředící pufr, připravený k použití, 13,5 ml
5. Ghrelin (Total) Standard – lyofilizovaný, po rekonstituci 2 ml
6. Ghrelin (Total) Quality Controls 1 a 2 – kontroly kvality 1 a 2, lyofilizované, po rekonstituci každá 1 ml
7. Precipitating Reagent – precipitační činidlo – obsahuje Goat anti-Rabbit IgG Serum, připravené k použití, 130 ml

Postup stanovení:

Den 1

1) Příprava kontrol kvality

- přidáme ke každé **Quality Control (1 a 2)** 1 ml destilované nebo deionizované vody, mírně promícháme a necháme 5 minut stát, pak dobře promícháme

2) Příprava standardů

- přidáme ke každému **Ghrelin (Total) Standard** 2 ml destilované nebo deionizované vody, mírně promícháme a necháme 5 minut odstát, pak dobře promícháme
- připravíme si šest zkumavek a označíme je 1, 2, 3, 4, 5, 6 a do každé přidáme 0,5 ml Assay Buffer. Provedeme sériové ředění tak, že do zkumavky 1 napipetujeme 0,5 ml rozpuštěného standardu, promícháme a ze zkumavky 1 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 2, promícháme a ze zkumavky 2 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 3, promícháme a ze zkumavky 3 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 4, promícháme a ze zkumavky 4 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 5, promícháme a ze zkumavky 5 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 6, promícháme
- při sériovém ředění měníme špičku pipety po přenesení každé koncentrace standardu do zkumavky

3) Vlastní stanovení hormonu

- očíslováme zkumavky 1–125 a při vlastním stanovení ghrelinu postupujeme podle návodu v Tabulce 1 (v příloze)

Den 2

- přidáme k izotopu ¹²⁵I- **Ghrelin** 13,5 ml **Label Hydrating Buffer** a mírně zamícháme
- dále postupujeme podle návodu v Tabulce 1

Den 3

- postupujeme podle návodu v Tabulce 1

3.3.2.2 Stanovení obestatinu

Pro stanovení obestatinu byl použit Obestatin (Human, Monkey) RIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA). Kit obsahuje dostatečné množství činidel pro použití pro 125 RIA zkumavek, stanovení je tří denní.

Dodávaná činidla:

1. RIA Buffer – ředící roztok, koncentrovaný, 50 ml
2. Standard Obestatin (Human, Monkey) – standard, lyofilizovaný, 12,8 g
3. Rabbit antiserum specific for the Obestatin (Human, Monkey) – králičí protilátka specifická pro obestatin, lyofilizovaná, 13 ml
4. ^{125}I -Obestatin – izotopově značený obestatin, lyofilizovaný (obsahuje $< 1,5 \mu\text{Ci}$)
5. Goat Anti-Rabbit IgG Serum (GAR) – protilátka, lyofilizovaná, 13 ml
6. Normal Rabbit Serum (NRS) – králičí sérum, lyofilizované, 13 ml
7. Positive Control – kontrola kvality, lyofilizovaná

Postup stanovení:

Den 1

1) Příprava činidel

- přidáme k **RIA buffer** 150 ml destilované vody, dobře promícháme
- přidáme k **Standard Obestatin (Human, Monkey)** 1 ml **Ria Buffer**, dobře promícháme a uchováváme v ledové tříšti

- přidáme k **Rabbit anti-Obestatin (Human, Monkey) serum** 13 ml **RIA buffer**, dobře promícháme a uchovááme v ledové tříšti

2) Příprava standardů

- přidáme ke **Standard Obestatin** 1 ml **RIA Buffer** a dobře promícháme.
- připravíme si devět zkumavek a označíme je O, A, B, C, D, E, F, G, H. Připravíme si standardy podle následujícího schématu:

O) 10 μ l rekonstituovaného standardu + 990 μ l ředícího roztoku = 128 000 pg/ml

A) 50 μ l standardu O + 950 μ l ředícího roztoku = 6 400 pg/ml

B) 500 μ l standardu A + 500 μ l ředícího roztoku = 3 200 pg/ml

C) 500 μ l standardu B + 500 μ l ředícího roztoku = 1 600 pg/ml

D) 500 μ l standardu C + 500 μ l ředícího roztoku = 800 pg/ml

E) 500 μ l standardu D + 500 μ l ředícího roztoku = 400 pg/ml

F) 500 μ l standardu E + 500 μ l ředícího roztoku = 200 pg/ml

G) 500 μ l standardu F + 500 μ l ředícího roztoku = 100 pg/ml

H) 500 μ l standardu G + 500 μ l ředícího roztoku = 50 pg/ml

- při sériovém ředění měníme špičku pipety po přenesení každé koncentrace standardu do zkumavky

3) Vlastní stanovení hormonu

- očíslováme zkumavky 1–125 a při vlastním stanovení obestatinu postupujeme podle návodu v Tabulce 2

Den 2

- přidáme k izotopu ¹²⁵I-Obestatin (Human, Monkey) 13 ml **RIA Buffer** a dobře promícháme

- dále postupujeme podle návodu v Tabulce 2

Den 3

- přidáme ke **Goat Anti-Rabbit IgG Serum (GAR)** 13 ml **RIA Buffer** a dobře promícháme
- přidáme k **Normal rabbit Serum (NRS)** 13 ml **RIA Buffer** a dobře promícháme
- dále postupujeme podle návodu v Tabulce 2

3.3.2.3 Stanovení neuropeptidu Y

Pro stanovení neuropeptidu Y byl použit Neuropeptide Y RIA Kit (DRG International, Inc., USA). Kit obsahuje dostatečné množství činidel pro použití pro 100 RIA zkumavek, stanovení je tří denní.

Dodávaná činidla:

1. Anti-NPY – králíčí protilátka specifická pro NPY, lyofilizovaná, po rekonstituci 22 ml
2. ^{125}I -NPY – izotopově značený NPY, lyofilizovaný, po rekonstituci 13,5 ml (obsahuje 500 KIU Trasylolu[®]/ml)
3. Double Antibody solid phase – dvojitá protilátka, obsahuje Anti-rabbit-Ig, připravená k použití, 13 ml
4. Standard diluent – roztok pro ředění standardů, lyofilizovaný, po rekonstituci 11,0 ml
5. NPY standard 3000 pmol/l – lyofilizovaný, po rekonstituci 5 ml
6. Assay buffer – ředící roztok, připravený k použití, 5 ml
7. Controls – Kontroly kvality, lyofilizované, po rekonstituci každá 2 ml

Postup stanovení:

Den 1

1) Příprava kontrol kvality

- přidáme ke každé **Controls (1 a 2)** 2 ml destilované vody, dobře promícháme

2) Příprava standardů

- přidáme k **NPY standard 3000 pmol/l** 5 ml destilované vody, dobře promícháme
- přidáme k **Standard diluent** 11 ml destilované vody, dobře promícháme
- připravíme si sedm zkumavek a označíme je A, B, C, D, E, F, G. Připravíme si standardy naředěním **NPY standard 3000 pmol/l** se **Standard diluent** podle následujícího schématu:

A) 0,200 ml standardu 3000 pmol/l + 1,800 ml diluentu = 300 pmol/l

B) 1,00 ml standardu 300 pmol/l + 1,00 ml diluentu = 150 pmol/l

C) 1,00 ml standardu 150 pmol/l + 1,00 ml diluentu = 75 pmol/l

D) 1,00 ml standardu 75 pmol/l + 1,00 ml diluentu = 37,5 pmol/l

E) 1,00 ml standardu 37,5 pmol/l + 1,00 ml diluentu = 18,8 pmol/l

F) 1,00 ml standardu 18,8 pmol/l + 1,00 ml diluentu = 9,4 pmol/l

G) **Standard diluent** = 0 pmol/l

3) Příprava činidel

- přidáme k **Anti-NPY** 22 ml destilované vody, dobře promícháme

4) Vlastní stanovení hormonu

- očíslovíme zkumavky 1–100 a při vlastním stanovení NPY postupujeme podle návodu v Tabulce 3

Den 2

- přidáme k izotopu $^{125}\text{I-NPY}$ 25 ml **destilované vody**, dobře promícháme
- dále postupujeme podle návodu v Tabulce 3

Den 3

- postupujeme podle návodu v Tabulce 3

3.3.2.4 Stanovení peptidu YY

Pro stanovení peptidu YY byl použit Human PYY (Total) RIA Kit (Linco Research, Inc.). Kit obsahuje dostatečné množství činidel pro použití pro 125 RIA zkumavek, stanovení je třídní.

Dodávaná činidla:

1. Assay Buffer – ředící roztok, připravený k použití, 20 ml
2. Antiserum – protilátka specifická pro PYY, obsahuje Guinea Pig anti-PYY Serum, připravená k použití, 13 ml
3. $^{125}\text{I-PYY}$ – izotopově značený PYY, lyofilizovaný, po rekonstituci 13,5 ml (obsahuje $< 1,5 \mu\text{Ci}$ (56 kBq))
4. Label Hydrating Buffer – ředící pufr, připravený k použití, 13,5 ml
5. Standard – lyofilizovaný, po rekonstituci 2 ml
6. Quality Controls 1 a 2 – kontroly kvality 1 a 2, lyofilizované, po rekonstituci každá 1 ml
7. Precipitating Reagent – precipitační činidlo – obsahuje Goat anti-Guinea Pig IgG Serum, připravené k použití, 130 ml

Postup stanovení:

Den 1

1) Příprava kontrol kvality

- přidáme ke každé **Quality Control (1 a 2)** 1 ml destilované nebo deionizované vody, mírně zamícháme a necháme 5 minut stát, pak dobře promícháme

2) Příprava standardů

- přidáme ke **Standard** 2 ml destilované nebo deionizované vody, mírně zamícháme a necháme 5 minut odstát, pak dobře promícháme
- připravíme si sedm zkumavek a označíme je 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a do každé přidáme 0,5 ml Assay Buffer. Provedeme sériové ředění tak, že do zkumavky 1 napipetujeme 0,5 ml rozpuštěného standardu, promícháme a ze zkumavky 1 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 2, promícháme a ze zkumavky 2 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 3, promícháme a ze zkumavky 3 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 4, promícháme a ze zkumavky 4 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 5, promícháme a ze zkumavky 5 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 6, promícháme
- při sériovém ředění měníme špičku pipety po přenesení každé koncentrace standardu do zkumavky
- výsledné koncentrace standardů budou 640 pg/ml, 320 pg/ml, 160 pg/ml, 80 pg/ml, 40 pg/ml, 20 pg/ml, 10 pg/ml

3) Vlastní stanovení hormonu

- očíslováme zkumavky 1–125 a při vlastním stanovení PYY postupujeme podle návodu v Tabulce 4

Den 2

- přidáme k izotopu ^{125}I - PYY 13,5 ml **Label Hydrating Buffer** a mírně promícháme

- dále postupujeme podle návodu v Tabulce 4

Den 3

- postupujeme podle návodu v Tabulce 4

3.3.2.5 Stanovení leptinu

Pro stanovení leptinu byl použit Human Leptin RIA Kit (Linco Research, Inc.). Kit obsahuje dostatečné množství činidel pro použití pro 125 RIA zkumavek, stanovení je dvoudenní.

Dodávaná činidla:

1. Assay Buffer – ředící roztok, připravený k použití, 20 ml
2. Human Leptin Antibody – králičí protilátka specifická pro leptin, připravená k použití, 13 ml
3. ¹²⁵I-Human Leptin – izotopově značený leptin, lyofilizovaný, po naředění 13,5 ml (obsahuje < 1,5 µCi (56 kBq))
4. Label Hydrating Buffer – ředící pufr, obsahuje Normal Rabbit IgG, připravený k použití, 13,5 ml
5. Human Leptin Standards – standardy, připravené k použití v těchto koncentracích: 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 1ml/každá lahvička
6. Quality Controls 1 a 2 – kontroly kvality 1 a 2, připravené k použití, 1 ml
7. Precipitating Reagent – precipitační činidlo – připravené k použití, 130 ml

Postup stanovení:

Den 1

- přidáme k izotopu ^{125}I - **Human Leptin** 13,5 ml **Label Hydrating Buffer**, promícháme a necháme stát při pokojové teplotě 30 minut, s občasným mírným promícháním
- očíslováme zkumavky 1–125 a při vlastním stanovení leptinu postupujeme podle návodu v Tabulce 5

Den 2

- postupujeme podle návodu v Tabulce 5

3.3.3 Stanovení hormonů metodou ELISA

Metodou enzymatického stanovení (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA), byly stanoveny plazmatické hladiny hormonů acyl ghrelinu a desacyl ghrelinu s využitím komerčně dostupných kitů.

Metoda ELISA je analytická metoda, využívaná ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů. Tato metoda je založena na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný a stanovuje se spektrofotometricky. Důležitým znakem metody ELISA je zakotvení antigenu nebo protilátky na nerozpustný nosič (povrch mikrotitrační destičky), což usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky v neznámém vzorku a stanovuje se pomocí standardní křivky.

3.3.3.1 Stanovení acyl ghrelinu

Pro stanovení acyl ghrelinu byl použit Active Ghrelin ELISA Kit (DRG International, Inc., USA). Kit obsahuje mikrotitrační destičku s 96 jamkami, stanovení je jednodenní.

Dodávaná činidla:

1. Antibody Coated Plate – destička s mikrotitračními jamkami, potažená monoklonální protilátkou proti lidskému acyl ghrelinu (na N-terminálním konci ghrelinu), 1 ks
2. Washing Buffer Concentrate – koncentrovaný promývací roztok, určený k naředění, 40 ml
3. Standard – standard, lyofilizovaný, po rekonstituci 2 ml
4. Quality Controls 1 a 2 – kontroly kvality, lyofilizované, po rekonstituci každá 1 ml
5. Assay Buffer – ředící roztok, připravený k použití, 22 ml
6. HRP Conjugated Antibody – konjugovaná protilátka proti lidskému acyl ghrelinu (na C-terminálním konci ghrelinu), určená k naředění, 250 μ l
7. HRP Dilution Buffer – roztok k ředění protilátky, připravený k použití, 22 ml
8. Substrate solution – roztok substrátu, připravený k použití, 22 ml
9. Stop Reagent – zastavovací činidlo, připravené k použití, 6 ml

Postup stanovení:

1) Příprava kontrol kvality

- přidáme ke každé **Quality Control (1 a 2)** 1 ml destilované nebo deionizované vody, mírně promícháme a necháme 5 minut stát, pak dobře promícháme

2) Příprava standardů

- přidáme ke **Standard** 1 ml destilované vody, mírně promícháme a necháme 5 minut stát, pak dobře promícháme
- připravíme si šest zkumavek a označíme je 1, 2, 3, 4, 5, 6 a do každé přidáme 0,5 ml **Assay Buffer**. Provedeme sériové ředění tak, že do zkumavky 1 napipetujeme 0,5 ml rozpuštěného standardu, promícháme a ze zkumavky 1

napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 2, promícháme a ze zkumavky 2
napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 3, promícháme a ze zkumavky 3
napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 4, promícháme a ze zkumavky 4
napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 5, promícháme a ze zkumavky 5
napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 6, promícháme

- při sériovém ředění měníme špičku pipety po přenesení každé koncentrace standardu do zkumavky

3) Příprava činidel

- naředíme **Wash Buffer** v poměru 1:20 tak, že do něj přidáme 760 ml destilované vody
- naředíme **HRP Conjugated Antibody** v poměru 1:100 tak, že k ní přidáme 222,5 ml **Dilution Buffer**

4) Vlastní stanovení hormonu

- při vlastním stanovení acyl ghrelinu postupujeme podle návodu v Tabulce 6

3.3.3.2 Stanovení desacyl ghrelinu

Pro stanovení desacyl ghrelinu byl použit Desacyl Ghrelin ELISA Kit (DRG International, Inc., USA). Kit obsahuje mikrotitrační destičku s 96 jamkami, stanovení je jednodenní.

Dodávaná činidla:

1. Antibody Coated Plate – destička s mikrotitračními jamkami, potažená monoklonální protilátkou proti lidskému desacyl ghrelinu (na N-terminálním konci ghrelinu), 1 ks
2. Washing Buffer Concentrate – koncentrovaný promývací roztok, určený k naředění, 40 ml
3. Standard – standard, lyofilizovaný, po rekonstituci 2 ml
4. Quality Controls 1 a 2 – kontroly kvality, lyofilizované, po rekonstituci každá 1 ml

5. Assay Buffer – ředící roztok, připravený k použití, 22 ml
6. HRP Conjugated Antibody – konjugovaná protilátka proti lidskému desacyl ghrelinu (na C-terminálním konci ghrelinu), určená k naředění, 250 μ l
7. HRP Dilution Buffer – roztok k ředění protilátky, připravený k použití, 22 ml
8. Substrate solution – roztok substrátu, připravený k použití, 22 ml
9. Stop Reagent – zastavovací činidlo, připravené k použití, 6 ml

Postup stanovení:

1) Příprava kontrol kvality

- přidáme ke každé **Quality Control (1 a 2)** 1 ml destilované nebo deionizované vody, mírně promícháme a necháme 5 minut stát, pak dobře promícháme

2) Příprava standardů

- přidáme ke **Standard** 1 ml destilované vody, mírně promícháme a necháme 5 minut stát, pak dobře promícháme
- připravíme si šest zkumavek a označíme je 1, 2, 3, 4, 5, 6 a do každé přidáme 0,5 ml **Assay Buffer**. Provedeme sériové ředění tak, že do zkumavky 1 napipetujeme 0,5 ml rozpuštěného standardu, promícháme a ze zkumavky 1 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 2, promícháme a ze zkumavky 2 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 3, promícháme a ze zkumavky 3 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 4, promícháme a ze zkumavky 4 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 5, promícháme a ze zkumavky 5 napipetujeme 0,5 ml do zkumavky 6, promícháme
- při sériovém ředění měníme špičku pipety po přenesení každé koncentrace standardu do zkumavky

3) Příprava činidel

- naředíme **Wash Buffer** v poměru 1:20 tak, že do něj přidáme 760 ml destilované vody
- naředíme **HRP Conjugated Antibody** v poměru 1:100 tak, že k ní přidáme 222,5 ml **Dilution Buffer**

4) Vlastní stanovení hormonu

- při vlastním stanovení desacyl ghrelinu postupujeme podle návodu v Tabulce 7

3.4 Statistické zpracování dat

V rámci jednotlivých částí výzkumu bylo použito následující statistické zpracování dat:

Studie I: Bazální plazmatické hladiny hormonů u pacientek s AN na počátku a konci šestitýdenní léčby

Naměřené hodnoty pacientek s AN před léčbou byly statisticky porovnány s hodnotami po léčbě pomocí párového neparametrického Wilcoxonova testu. Hodnoty pacientek s AN před léčbou a po léčbě byly porovnány s hodnotami kontrolního souboru zdravých žen za použití Kruskal-Wallisova testu následovaného Kruskal-Wallisovými Z-testy vícenásobného porovnávání. Hladina statistické významnosti byla zvolena $p < 0,05$. Pro statistickou analýzu dat jsme použili statistický software NCSS 2002 (Kaysville, Utah, USA).

Studie II: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové snídani u zdravých žen

Pro hodnocení časového průběhu závisle proměnných jsme použili modely analýzy variance s opakováním (ANOVA). Rozdíly mezi skupinami jsme hodnotili vícenásobným porovnáváním metodou nejmenšího významného rozdílu. Hladina významnosti byla zvolena $p < 0,05$ pro ANOVU i pro vícenásobné porovnávání. Vzhledem k tomu, že data u všech závislých proměnných neměla normální rozdělení, byla data transformována mocninnou transformací k dosažení získání symetrie rozdělení a konstantního rozptylu

v datech i reziduích. Pro statistickou analýzu dat jsme použili statistický software NCSS 2002 (Kaysville, Utah, USA).

Studie III: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové snídani u pacientek s AN a BN

Pro hodnocení závislosti hladin hormonů na statusu pacienta a stádiu jídelního testu jsme použili metody analýzy variance s opakováním (ANOVA). Model se skládal z faktorů subjekt, status pacienta, stádium jídelního testu (čas) a interakce status pacienta x stádium jídelního testu. Hodnocení ANOVA modelů bylo následováno vícenásobným porovnáváním metodou nejmenšího významného rozdílu. Hladina statistické významnosti byla zvolena $p < 0,05$ pro ANOVU i pro vícenásobné porovnávání. Data u všech závislých proměnných neměla normální rozdělení, proto byla transformována mocninnou transformací k dosažení získání symetrie rozdělení a konstantního rozptylu v datech i reziduích. K vyhledání nehomogenit po transformaci proměnných jsme použili reziduální analýzu. Pro transformaci dat a analýzu variance jsme použili software Statgraphics Centurion verze XV (Statpoint Herndon, Virginia, USA).

Vztahy mezi NPY a statusem pacienta, hladinami ghrelinu a obestatinu byly hodnoceny vícerozměrnou regresí s redukcí dimensionalit metodou ortogonálních projekcí do latentních struktur, která je robustní k multikolinearitě. Rovněž v případě vícerozměrné regrese byla data transformována. Pro statistickou analýzu dat jsme použili statistický software SIMCA verze 12.0 (Umetrics, Umea, Švédsko).

Studie IV: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové a proteinové snídani u pacientek s AN a BN

Rozšířili jsme předchozí model statistického zpracování, který jsme použili pro hodnocení dat po konzumaci sacharidové snídani ve studii III, přidali jsme do modelu faktor snídani a vzájemné interakce mezi faktory. Pro statistickou analýzu dat jsme použili statistický software Statgraphics Centurion verze XV (Statpoint Herndon, Virginia, USA).

Vztahy mezi sledovanými antropometrickými, biochemickými a hormonálními parametry v rámci jednotlivých skupin jsme hodnotili Spearmanovými korelacemi, použili jsme statistický software NCSS 2004 (Kaysville, Utah, USA).

Vztahy mezi statusem anorexia nervosa/bulimia nervosa a ostatními sledovanými parametry byly hodnoceny vícerozměrnou regresí s redukcí dimensionality metodou ortogonálních projekcí do latentních struktur. Data byla transformována mocninnou transformací k dosažení získání symetrie rozdělení a konstantního rozptylu. Pro statistickou analýzu dat jsme použili statistický software SIMCA verze 12.0 (Umetrics, Umea, Švédsko).

4 VÝSLEDKY

4.1. Studie I: Bazální plazmatické hladiny hormonů u pacientek s AN na počátku a konci šestitýdenní léčby

U pacientek s AN byly měřeny bazální plazmatické hladiny hormonů na počátku léčby a znovu po šesti týdnech léčby. Naměřené hodnoty byly porovnány s hodnotami kontrolního souboru zdravých žen a u skupiny pacientek s AN byly hodnoceny změny v hladinách hormonů na počátku a konci léčby. Měřeny byly bazální plazmatické hladiny ghrelinu, leptinu, NPY, IGF-I a IGFBP-III. Naměřené hodnoty a porovnání se zdravými ženami jsou uvedeny v Tabulce 8 a Grafu 1–3. Výsledky z této studie byly prezentovány v Beranová et al. (2009).

Bazální plazmatické hladiny ghrelinu a NPY byly zjištěny u pacientek s AN před léčbou významně vyšší než u zdravých žen, zatímco hladiny leptinu, IGF-I, IGFBP-III a BMI měly tyto pacientky významně snížené. Po šesti týdnech léčby se hladiny ghrelinu u pacientek s AN snížily, ale stále zůstaly významně vyšší než u zdravých žen. Plazmatické hladiny leptinu se u pacientek během léčby zvýšily, zůstaly však stále významně nižší než naměřené hodnoty zdravých žen. V hladinách plazmatického NPY nedošlo během léčby u pacientek s AN ke změnám. Hladiny IGF-I a IGFBP-III se během léčby u pacientek významně zvýšily a dosáhly hodnot srovnatelných s hodnotami zdravých žen. Hodnota BMI se během léčby významně zvýšila, ale ještě nedosáhla hodnoty zdravých žen.

4.2. Studie II: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové snídane u zdravých žen

V této studii byla podávána zdravým ženám sacharidová snídane a byly sledovány bazální hladiny hormonů a jejich postprandiální změny po konzumaci snídane. Měřeny byly plazmatické hladiny obestatinu, total ghrelinu, acyl ghrelinu a desacyl ghrelinu. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 9, grafické znázornění sledovaných hormonů je zobrazeno v Grafu 4 (procentuální hodnoty poklesu hormonů). Výsledky z této studie byly prezentovány v Sedláčková et al. (2008).

Zjistili jsme, že po konzumaci snídaně došlo k poklesu hladin všech sledovaných hormonů. Významně poklesly plazmatické hladiny total ghrelinu a obestatinu při porovnání s bazálními hodnotami a dosáhly nejnižších hodnot 120 minut po jídle u total ghrelinu (pokles na $80,7 \pm 4,33\%$ výchozí bazální hodnoty) a 90 minut po jídle u obestatinu (pokles na $82,9 \pm 4,89\%$). Hladiny acyl ghrelinu klesly významně pouze ve 30. minutě po jídle ($67,7 \pm 13,67\%$). Významně klesly po jídle také plazmatické hladiny desacyl ghrelinu při porovnání s bazálními hodnotami, s nejnižší hodnotou 60 minut po jídle ($45,3 \pm 11,88\%$). Preprandiální poměr ghrelin/obestatin byl $5,9 \pm 0,5$ a nezjistili jsme v tomto poměru žádnou postprandiální změnu. Dále jsme sledovali plazmatické hladiny inzulinu a NPY. Hladiny inzulinu se po jídle významně zvýšily a dosáhly nejvyšší hodnoty 30 minut po konzumaci snídaně ($661,9 \pm 12,23\%$). Plazmatické hladiny NPY byly významně nižší než bazální hodnoty 90 minut ($77,68 \pm 8,04\%$) a 150 minut ($77,26 \pm 8,16\%$) po jídle.

Vzájemné vztahy mezi sledovanými parametry jsou uvedeny v Tabulce 10. Obestatin pozitivně koreloval s total ghrelinem, desacyl ghrelinem a NPY. Total ghrelin pozitivně koreloval kromě obestatinu s acyl i desacyl ghrelinem a všechny typy ghrelinu – total, acyl i desacyl ghrelin korelovaly pozitivně s NPY. Poměr ghrelin/obestatin pozitivně koreloval s BMI.

4.3. Studie III: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové snídaně u pacientek s AN a BN

V této studii byla podávána sacharidová snídaně pacientkám s AN a BN a naměřené bazální hodnoty hormonů a jejich postprandiální změny byly porovnávány s hodnotami zdravých žen. Měřili jsme plazmatické hladiny ghrelinu, obestatinu a NPY a stanovili jsme poměr ghrelin/obestatin. Základní antropometrické a biochemické parametry sledovaných skupin jsou uvedeny v Tabulce 11, grafické znázornění sledovaných hormonů je uvedeno v Grafu 5–8 a hodnoty hormonů v Tabulce 13. Výsledky z této studie byly prezentovány v Sedláčková et al. (2011).

Antropometrické a biochemické parametry sledovaných skupin

Pacientky s AN měly významně nižší tělesnou hmotnost, než pacientky s BN a zdravé ženy. Pacientky s BN měly hmotnost srovnatelnou se zdravými ženami. V tělesné

výšce nebyly mezi skupinami zjištěny žádné rozdíly. Vypočítané BMI bylo významně nižší u pacientek s AN v porovnání s ostatními dvěma skupinami, pacientky s BN a zdravé ženy měly BMI navzájem srovnatelné. U pacientek s AN bylo naměřeno významně nižší množství tukové hmoty a významně vyšší množství tukuprosté hmoty, než u pacientek s BN a zdravých kontrol.

U pacientek s AN byly naměřeny významně nižší plazmatické hladiny IGF-I a IGF-BP-III, než u pacientek s BN a zdravých žen. Hladiny IGF-I se u pacientek s BN a zdravých žen významně nelišily, stejně jako hladiny IGF-BP-III.

Ghrelin

Plazmatické hladiny ghrelu byly u pacientek s AN oproti zdravým kontrolám i pacientkám s BN významně zvýšené bazálně i postprandiálně. Postprandiálně došlo u pacientek s AN k významnému poklesu hladin ghrelu s nejnižší dosaženou hodnotou 60 min po jídle. Nebyl nalezen významný rozdíl mezi hodnotami v hladinách ghrelu u pacientek s BN a u zdravých kontrol, bazálně ani postprandiálně. Po konzumaci sacharidové snídaně hodnoty ghrelu významně klesly u pacientek s BN i u zdravých kontrol, a dosáhly nejnižších hodnot 90 min po jídle u obou těchto skupin.

Obestatin

Plazmatické hladiny obestatinu vykazovaly ve svém průběhu podobnou tendenci jako hladiny ghrelu. Nejvyšší bazální i postprandiální hodnoty byly naměřené u pacientek s AN, kde se hodnoty významně lišily od ostatních dvou skupin. Po jídle hladiny obestatinu významně poklesly, s nejnižší postprandiální hodnotou 90 min po jídle. U pacientek s BN byly naměřené hodnoty obestatinu nižší než u pacientek s AN, ale stále významně vyšší než hodnoty zdravých kontrol. Stejně jako u pacientek s AN po snídani významně poklesly a dosáhly nejnižší postprandiální hodnoty 90 min po jídle. Plazmatické hladiny obestatinu u zdravých kontrol dosahovaly ze všech tří skupin nejnižších číselných hodnot v celém svém průběhu, minimální postprandiální hodnoty bylo dosaženo také 90 min po jídle.

U všech sledovaných skupin byl stanoven poměr ghrelin/obestatin. U pacientek s AN byl tento poměr nižší, než u zdravých kontrol, ale ne významně. U pacientek s BN byl poměr ghrelin/obestatin významně nižší než u zdravých kontrol i pacientek s AN. Postprandiálně se poměr ghrelin/obestatin neměnil u žádné ze sledovaných skupin.

Neuropeptid Y

V plazmatických hladinách NPY byl zjištěn rozdíl v bazálních hodnotách mezi pacientkami s BN a zdravými kontrolami, u pacientek s BN byly naměřené hodnoty NPY významně vyšší. Mezi pacientkami s AN a kontrolami významný rozdíl v bazálních hodnotách zjištěn nebyl, i když zde existovala určitá tendence k tomuto rozdílu. Postprandiálně se hladiny NPY významně lišily u pacientek s AN i pacientek s BN od zdravých kontrol, naměřené hodnoty u obou skupin pacientek byly významně vyšší v celém postprandiálním průběhu. Mezi postprandiálními hladinami NPY u obou skupin pacientek navzájem nebyl nalezen významný rozdíl. Hodnoty u pacientek s AN vykazovaly oproti bazální hodnotě nevýznamnou zvyšující se tendenci, u pacientek s BN nevýznamnou snižující se tendenci v průběhu jídelního testu. U zdravých kontrol došlo k významnému snížení hodnot NPY po konzumaci snídaně, s minimální hodnotou dosaženou 90 min po jídle.

Vztahy mezi sledovanými parametry

Vyhodnocené vztahy mezi NPY, ghrelinem, obestatinem a statusem onemocnění AN a BN jsou uvedeny v Tabulce 12. NPY pozitivně korelovalo se statusem AN i BN, a negativně se zdravými kontrolami, což znamená, že u onemocnění AN a BN jsou hodnoty NPY vyšší než u zdravých kontrol. NPY také silně pozitivně korelovalo s obestatinem a méně silně, ale stále významně s ghrelinem.

4.4. Studie IV: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové a proteinové snídaně u pacientek s AN a BN

V této studii jsme porovnávali vliv sacharidové a proteinové snídaně na plazmatické hladiny hormonů u pacientek s AN a BN a u zdravých kontrolních žen. Pacientkám byla podána nejdříve sacharidová snídaně a po uplynutí jednoho týdne snídaně proteinová. Naměřené bazální hodnoty hormonů pacientek s AN a BN a jejich postprandiální změny byly porovnány s hodnotami zdravých žen a také u obou skupin pacientek navzájem. Měřili jsme plazmatické hladiny ghrelinu, obestatinu, NPY, PYY a leptinu. Základní antropometrické a biochemické parametry sledovaných skupin jsou uvedeny v Tabulce 14, výsledky sledovaných hormonů po příjmu sacharidové a proteinové snídaně jsou zobrazeny v Grafech 9–13. Výsledky z této studie byly prezentovány v Sedláčková et al. (2012).

Antropometrické a biochemické parametry sledovaných skupin

Pacientky s AN měly významně nižší tělesnou hmotnost, než pacientky s BN i zdravé ženy, průměrná hmotnost pacientek s BN se nelišila od hmotnosti zdravých žen. Tělesná výška byla srovnatelná u pacientek s AN, BN i zdravých žen. Pacientky s AN měly významně nižší BMI, než pacientky s BN i zdravé ženy. BMI u pacientek s BN a zdravých žen se významně nelišilo. Pacientky s AN měly významně nižší množství tukové hmoty, než u pacientky s BN a zdravé ženy.

Z biochemických parametrů jsme sledovali bazální plazmatické hladiny IGF-I a IGFBP-III. Zjistili jsme významně nižší plazmatické hladiny IGF-I a IGF-BP-III u pacientek s AN, při porovnání s pacientkami s BN i zdravými ženami. U pacientek s BN dosahovaly plazmatické hladiny IGF-I a IGFBP-III srovnatelných hodnot s hodnotami zdravých žen.

Ghrelin

Zjistili jsme, že pacientky s AN měly významně zvýšené bazální i postprandiální plazmatické hladiny ghrelinu, ve srovnání s kontrolami a pacientkami s BN. Po obou

typech snídaní došlo u pacientek s AN k poklesu hladin ghrelinu, minimální hodnoty bylo dosaženo 90 minut po jídle u sacharidové snídaně a 30 minut po jídle u proteinové snídaně. Faktor snídaně nebyl u pacientek s AN významný, ale interakce snídaně x čas ukázala odlišný průběh hormonu v čase po konzumaci sacharidové a proteinové snídaně. U pacientek s BN byly hodnoty bazálních i postprandiálních hladin ghrelinu srovnatelné s hodnotami zdravých žen. Po obou typech snídaní hladiny ghrelinu poklesly, tento pokles byl však významný pouze po sacharidové snídani. Minimálních hodnot ghrelinu bylo dosaženo 90 minut po sacharidové snídani a 30 minut po proteinové snídani (stejně, jako u pacientek s AN). Průběh hormonu v čase byl po konzumaci sacharidové a proteinové snídaně u pacientek s BN různý. U zdravých kontrolních žen plazmatické hodnoty ghrelinu také poklesly po obou typech snídaně a dosáhly nejnižších hodnot 120 minut po sacharidové snídani a v 60 minut po proteinové snídani. Faktor snídaně byl významný, podle interakce snídaně x čas se však celkový průběh hormonu v čase nelišil po konzumaci sacharidové a proteinové snídaně. Významná interakce status x snídaně ukazuje, že reakce ghrelinu po podání snídaní byla odlišná u jednotlivých sledovaných skupin.

Obestatin

Bazální plazmatické hladiny obestatinu byly významně zvýšené u pacientek s AN i pacientek s BN při porovnání se zdravými ženami. Nejvyšší bazální hodnoty jsme naměřili u pacientek s AN, podobně jako u ghrelinu. U pacientek s AN hladiny obestatinu postprandiálně poklesly po obou typech snídaní. Po sacharidové snídani dosáhly nejnižších hodnot 90 minut po jídle a po proteinové snídani 30 minut po jídle. Faktor snídaně ani interakce snídaně x čas nebyly u pacientek s AN významné, a reakce obestatinu na sacharidovou a proteinovou snídani se tedy v čase nelišily. U pacientek s BN významně poklesly hladiny obestatinu po obou typech snídaní, s minimálními hodnotami 90 min po sacharidové snídani a 150 min po proteinové snídani. Podle faktoru snídaně i interakce snídaně x čas byl průběh obestatinu po obou typech snídaní odlišný. U zdravých kontrolních žen hladiny obestatinu také významně poklesly po obou typech snídaní a průběh obestatinu v čase byl různý. Podle celkové interakce status x snídaně se reakce obestatinu na snídaně u sledovaných skupin nelišila, přestože hladiny obestatinu dosahovaly významně odlišných hodnot u jednotlivých skupin.

Neuropeptid Y

Bazální i postprandiální plazmatické hladiny NPY byly významně zvýšené u pacientek s AN i BN ve srovnání s kontrolami. U pacientek s AN nebyly nalezeny žádné postprandiální změny v hladinách NPY po obou typech snídání, ale u pacientek s BN a zdravých kontrol hladiny NPY poklesly po sacharidové snídání. Po proteinové snídání nenastaly žádné změny. Podle interakce snídání x čas, která byla nevýznamná u všech sledovaných skupin, se průběh hladin NPY v čase nelišil po konzumaci sacharidové a proteinové snídání, a žádné odlišnosti v reakci NPY na snídání nebyly nalezeny ani mezi sledovanými skupinami, jak ukázala interakce status x snídání.

Peptid YY

Bazální plazmatické hladiny PYY byly naměřeny v podobném rozmezí hodnot u všech sledovaných skupin. Zjistili jsme však významné rozdíly v postprandiálních odpovědích PYY na sacharidovou a proteinovou snídání u pacientek s AN a BN, při porovnání s kontrolami. U pacientek s AN a BN byly plazmatické hladiny PYY významně zvýšené po obou typech snídání, po proteinové snídání však dosáhly výrazně vyšších hodnot než po snídání sacharidové. Maximální hodnoty byly dosaženy u pacientek s AN 120 min po sacharidové i proteinové snídání, u pacientek s BN 30 min po sacharidové snídání a 90 min po proteinové snídání. U zdravých žen nastalo také zvýšení hladin PYY po proteinové snídání, nebylo však významné a dosažené hodnoty byly signifikantně nižší než u pacientek s AN a BN. Podle významné interakce status x snídání se odpovědi PYY na konzumaci snídání lišily u jednotlivých skupin.

Leptin

Bazální plazmatické hodnoty leptinu byly významně nižší u pacientek s AN i BN, při porovnání se zdravými ženami. Nejnižších hodnot dosahovaly plazmatické hladiny leptinu u pacientek s AN, hladiny leptinu u pacientek s BN byly vyšší než u pacientek s AN, ale stále významně nižší, než hodnoty zdravých žen. Nenalezli jsme žádné postprandiální změny v hodnotách leptinu po sacharidové ani proteinové snídání u žádné ze sledovaných skupin.

Vztahy mezi sledovanými parametry

Vztahy mezi sledovanými parametry jsou uvedeny v Tabulce 15–17, zvlášť pro jednotlivé skupiny. U pacientek s AN korelovaly vzájemně antropometrické parametry a dále tělesná hmotnost a BMI s IGF-1. Ghrelin koreloval pozitivně s tukovou hmotou a leptin pozitivně s BMI. U pacientek s BN korelovaly vzájemně antropometrické parametry, ghrelin koreloval negativně s hmotností a leptin koreloval pozitivně s hmotností, BMI a tukovou hmotou. U zdravých žen korelovaly vzájemně antropometrické parametry a NPY koreloval pozitivně s obestatinem.

Vztahy mezi onemocněními AN a BN a sledovanými parametry

Vztahy mezi statusem onemocnění AN a BN a ostatními sledovanými parametry jsou uvedeny v Grafu 14–15. Status onemocnění anorexia nervosa pozitivně koreloval s plazmatickou hladinou ghrelu, obestatinu, NPY a PYY a negativně s hladinou leptinu, tělesnou hmotností a BMI.

Status onemocnění bulimia nervosa pozitivně koreloval s plazmatickou hladinou NPY, obestatinu a PYY, a negativně s hladinou leptinu, tělesnou hmotností a BMI.

5 DISKUZE

Diskuze je členěna na části, tématicky navazujícími na členění předchozí kapitoly Výsledky.

5.1 Studie I: Bazální plazmatické hladiny hormonů u patientek s AN na počátku a konci šestitýdenní léčby

V této studii jsme sledovali u patientek s AN bazální hodnoty hormonů souvisejících s řízením příjmu potravy na začátku hospitalizace a jejich změny po šestitýdenní nutričně rehabilitační léčbě, a porovnávali jsme je s hodnotami naměřenými u skupiny zdravých žen. Měřili jsme bazální plazmatické hladiny NPY, ghrelinu, leptinu, IGF-1 a IGFBP-3. Patientky s AN měly zvýšené bazální plazmatické hladiny NPY, což bylo zjištěno i v některých dalších studiích (Escobar et al, 2002; Oświecimska et al., 2005), naopak Baumann et al. (2010) uvádějí hladiny NPY u těchto patientek snižené. Ve studii Escobara et al. (2005) plazmatické hodnoty NPY po šestnáctitýdenním realimentačním období a váhovém příbytku patientek s AN poklesly. My jsme po kratším šestitýdenním léčebném období nezaznamenali v hladinách plazmatického NPY žádné změny a jeho hodnoty zůstaly u patientek s AN oproti zdravým ženám vysoké. Jedním z možných vysvětlení může být, že NPY má funkci dlouhodobého regulátoru příjmu potravy a jeho hladiny se mění až po déletrvajících změnách výživového stavu organismu. Nález vysokých bazálních hladin NPY u patientek s AN jsme následně potvrdili při našem dalším výzkumu.

Plazmatické hladiny ghrelinu jsme naměřili u patientek s AN na počátku léčby zvýšené oproti zdravým ženám. Po šesti týdnech léčby hladiny ghrelinu významně poklesly, stále však zůstaly vyšší, než naměřené hodnoty zdravých žen. Tyto výsledky ukazují na částečné potlačení chronického hladovění u patientek s AN a jsou v souladu s ostatními studii (Otto et al., 2001; Kršek et al., 2002; Bronský et al., 2004). Plazmatické hladiny leptinu měly patientky s AN výrazně snižené, v souvislosti s nadměrným úbytkem tukové tkáně. Po šesti týdnech léčby se hladiny leptinu zvýšily, i když zůstaly stále nižší, než hodnoty zdravých žen. Tyto výsledky korespondují se studii ostatních autorů (Haluzík et al., 1999; Svobodová et al., 1999; Tagami et al., 2004), ve studii Bronského et al. (2011) se hladiny leptinu po osmitýdenní léčbě zvýšily až na úroveň zdravých žen.

Dále jsme naměřili u pacientek s AN snížené hladiny IGF-1 a IGFBP-3, které vypovídají o hodnotách sekrece růstového hormonu a jsou také tzv. nutričními indikátory (Hotta et al., 2000). Po léčbě se hladiny IGF-1 a IGFBP-3 u pacientek zvýšily na hodnoty srovnatelné s hodnotami zdravých žen, a tento nálezn je v souladu se studiemi dalších autorů (Counts et al., 1992; Hotta et al., 2000; Bronský et al., 2011). Potvrdili jsme tak, že IGF-1 a IGFBP-3 představují citlivé indikátory výživového stavu u pacientů s AN a BN. Tělesná hmotnost a hodnoty BMI se během šestitýdenní léčby u pacientek s AN významně zvýšily, nedosáhly však ještě minimální hodnoty udávané pro zdravé ženy. Ze získaných výsledků je zřejmé, že ghrelin, leptin, IGF-1 a IGF-BP-3 reagují na aktuální nutriční stav organismu a mění se u pacientek s anorexia nervosa spolu s nárůstem tělesné hmotnosti již během šestitýdenní léčby, zatímco u NPY v tak krátké době k výrazné změně plazmatických hladin nedochází.

5.2 Studie II: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové snídaně u zdravých žen

V další studii jsme se zaměřili na sledování změn v plazmatických hladinách hormonů po konzumaci sacharidové snídaně u skupiny zdravých žen. Měřili jsme bazální a postprandiální plazmatické hladiny obestatinu, total ghrelinu, acyl a desacyl ghrelinu a NPY. Zjistili jsme, že po konzumaci sacharidové snídaně u zdravých žen významně poklesly plazmatické hladiny obestatinu, a stejně tak i plazmatické hladiny total ghrelinu, acyl a desacyl ghrelinu. Dále jsme zjistili během postprandiálního období pozitivní korelace obestatinu s total ghrelinem, desacyl ghrelinem a NPY.

Původní tvrzení o anorexigenní úloze obestatinu u myši (Zhang et al., 2005) bylo později popřeno většinou následujících studií, jejichž autoři uvádějí, že nebylo možné počáteční nálezy zopakovat (Gourcerol et al., 2006; Samson et al., 2006; De Smet et al., 2007; Holst et al., 2007; Nogueiras et al., 2007). Zatímco prvotní výzkumy uváděly, že u hladovějících myši může obestatin zvrátit ghrelinem indukovaný příjem potravy, v dalších studiích nebylo toto vzájemné působení potvrzeno, a to ani při podávání obestatinových injekcí krmeným nebo hladovějícím myším (Seoane et al., 2006), ani během sedmidenní obestatinové léčby u myši (Nogueiras et al., 2007). My jsme zjistili, že u zdravých žen po sacharidovém jídle nastává v plazmatických hladinách obestatinu pokles, podobně jako v hladinách ghrelinu. Tento nálezn podporuje představu, že tyto dva štěpné produkty

jednoho genu mají během postprandiálního nasycení vzájemně se doplňující funkci. Dalším možným vysvětlením může však být i to, že funkce obestatinu po příjmu potravy je antagonistická k orexigenním účinkům ghrelinu, a že tedy mezi těmito dvěma peptidy existuje nějaký druh negativní zpětné vazby, kdy obestatin postprandiálně tlumí účinky ghrelinu.

U obézních osob byl zjištěn vyšší preprandiální poměr ghrelin/obestatin, ale dvě hodiny po příjmu potravy se tento poměr již nelišil při porovnání obézních a štíhlých osob (Guo et al., 2007). Tento náález dává vzniknout hypotéze, že preprandiální poměr ghrelin/obestatin může být důležitý v etiologii a patofyziologii obezity. My jsme zjistili, že u skupiny zdravých mladých žen poměr ghrelin/obestatin koreloval kladně s BMI, zatímco samotný ghrelin ani obestatin s BMI nekorelovaly. Stejně tak u zdravých žen obestatin nekoreloval s BMI ani v naší další studii (Zamrazilová et al., 2008). Toto zjištění může napovídat o zajímavé úloze rovnováhy mezi těmito dvěma hormony, a to zejména ve vztahu k dalším hormonálním, metabolickým a antropometrickým parametrům, a je třeba dalších výzkumů k jeho objasnění.

Již ve více studiích byl dokumentován postprandiální pokles total ghrelinu po sacharidové snídani u zdravých lidí (Monteleone et al., 2003; Erdmann et al., 2004; Blom et al., 2005; Marzullo et al. 2006). Dosud však ještě nebyla objasněna úloha acylované a desacylované formy ghrelinu v postprandiální regulaci sytosti. Ve studii Lucidiho et al. (2004) byl acyl ghrelin u zdravých jedinců signifikantně potlačen příjmem jídla o 38% a také ve studii Tentolourise et al. (2004) došlo k významnému poklesu hladiny acyl ghrelinu v séru po konzumaci sacharidové snídaně. Bylo prokázáno, že na rozdíl od acyl ghrelinu, desacyl ghrelin způsobuje negativní energetickou rovnováhu snižováním příjmu potravy a zpomalováním žaludečního vyprazdňování (Asakawa et al., 2005). U myši bylo zjištěno, že centrální desacyl ghrelin může aktivovat orexin-exprimující neurony, které mohou mít vliv na regulaci krmení (Toshinai et al., 2006). Naše výsledky ukázaly, že po sacharidové snídani významně klesají hladiny nejen celkového ghrelinu, ale také jeho acylované a desacylované formy, a stejně tak i hladiny obestatinu. Je velmi spekulativní, jaká je úloha poklesu těchto jednotlivých hormonů. Jedna z hypotéz předpokládá, že neacylovaný ghrelin by mohl tlumit účinky acylovaného ghrelinu (Broglia et al., 2004; Gauna et al., 2004), a že poměr produkce acylovaného a neacylovaného ghrelinu tak může

napomáhat při regulaci rovnováhy mezi adipogenezí a lipolýzou při odpovědi na výživový stav organismu (Thompson et al., 2004).

Ghrelin je považován za hlavní regulátor orexigenních peptidů NPY a AgRP (Rosická et al., 2002; Pfaff et al., 2004; Miura et al., 2006; Dardennes et al., 2007). Nedávné studie provedené u lidí ukázaly významné zvýšení hladin plazmatického NPY po injekci ghrelinu (Coiro et al., 2006) a stimulační účinek ghrelinu na transkripci NPY genu in vitro (Goto et al., 2006). Naše výsledky ukazují pozitivní korelaci mezi obestatinem, celkovým ghrelinem, acyl ghrelinem, desacyl ghrelinem a NPY. Toto zjištění podporuje představu úlohy peptidů odvozených z proghrelinu v regulaci příjmu potravy a energetických zásob cestou NPY, přestože mechanismy, kterými tyto peptidy stimulují neurony uvolňující NPY, nejsou dosud zcela zřejmé.

5.3 Studie III: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové snídani u pacientek s AN a BN

V této studii jsme zkoumali vliv konzumace sacharidové snídani na plazmatické hladiny hormonů u pacientek s AN a BN a naměřené hodnoty jsme porovnávali s hodnotami zdravých žen. Měřili jsme bazální a postprandiální plazmatické hladiny obestatinu, ghrelinu a NPY. Zjistili jsme, že u obou skupin pacientek byly naměřeny zvýšené hodnoty NPY oproti zdravým kontrolám. Hladiny NPY se u pacientek s AN a BN po konzumaci snídani neměnily, zatímco u zdravých žen došlo postprandiálně k poklesu plazmatických hladin NPY. Dále měly pacientky s AN zvýšené bazální i postprandiální hladiny obestatinu a ghrelinu oproti zdravým kontrolám. Pacientky s BN měly významně zvýšené hladiny obestatinu, ale nikoliv ghrelinu, který u nich byl na srovnatelné úrovni s kontrolami. Po konzumaci snídani hladiny ghrelinu a obestatinu u pacientek s AN i BN postprandiálně poklesly.

V jedné z předchozích studií bylo doloženo, že u pacientek s AN nedocházelo k poklesu hladin zvýšeného plazmatického ghrelinu po standardní snídani (Nedvídková et al., 2003). Odpověď ghrelinu na příjem potravy může tedy pravděpodobně ovlivnit typ nutričních a celkové množství kalorií, které jsou v jídle obsaženy, jak bylo prokázáno ve studiích s jídlem obsahujícím vysoké množství tuku (Nedvídková et al., 2003; Erdmann et al., 2004; Nakai et al., 2004; Otto et al., 2005). Naš výzkum ukazuje, že u pacientek s AN

jsou bazální plazmatické hladiny ghrelinu i obestatinu zvýšené při porovnání se zdravými ženami, což je v souladu se studiemi dalších autorů (Harada et al., 2008; Monteleone et al., 2008; Nakahara et al., 2008; Germain et al., 2009). U pacientek s BN se bazální hodnoty ghrelinu nelišily od zdravých kontrol, stejně jako u většiny dalších studií (Nakazato et al., 2004; Monteleone et al., 2005; Troisi et al., 2005). Někteří z ostatních autorů předpokládají, že je nepravděpodobné, aby ghrelin hrál roli v patofyziologii BN (Monteleone et al., 2005; Troisi et al., 2005). Naopak Tanaka et al. (2002) ve své studii ukázali, že průměrné plazmatické hladiny ghrelinu u pacientek s BN byly signifikantně vyšší než u kontrol, třebaže průměrné BMI měly obě skupiny podobné. Tyto nálezy mohou vést k předpokladu, že abnormální jídelní chování u onemocnění bulimia nervosa s různě intenzivními epizodami přejídání a zvracení může mít různý vliv na žaludeční sekreci ghrelinu a na jeho cirkulujícího hladiny. U pacientek s BN mohou být zvýšené bazální hladiny plazmatického obestatinu a současně normální hladiny plazmatického ghrelinu vysvětleny účinkem těchto dvou hormonů na různých úrovních regulace jídelního chování, odlišnými cestami působení těchto hormonů nebo jejich rozdílnou citlivostí k jídelnímu chování pacientek s BN.

Můžeme spekulovat, že řízení energetické homeostázy by mohlo být ovlivněno poměrem ghrelinu a obestatinu. My jsme našli poměr ghrelin/obestatin snížený u skupiny pacientek s BN a nevýznamně nižší u skupiny pacientek s AN. Nepotvrdili jsme tak vyšší poměr ghrelin/obestatin u pacientek s AN, který ve své studii zjistili Monteleone et al. (2008). Tito autoři věří, že příčinou této skutečnosti mohla být vyšší prevalence epizod přejídání a zvracení u pacientů s AN v jejich skupině (Monteleone et al., 2008). Naše výsledky podporují spíše předchozí nálezy Germain et al. (2009), která popsala snížený poměr acyl ghrelinu k obestatinu a celkového ghrelinu k obestatinu u pacientek s AN, při porovnání s konstitučně štíhlými ženami a kontrolními osobami.

Dosud žádná studie neukázala zvýšení bazálních hodnot NPY a absenci odpovědi po podání sacharidové snídani u pacientek s AN i BN, při porovnání se zdravými ženami. V nedávné době bylo objeveno nové periferní místo pro biosyntézu NPY v adipocytech, kde NPY stimuluje proliferaci primárních preadipocytů (Kos et al., 2007; Yang et al., 2008) a podílí se tak na adipogenezi. Můžeme se domnívat, že tímto způsobem NPY vede ke zvýšení funkčnosti obranného systému organismu před vyčerpáním energetických zásob. Zvýšené hladiny plazmatického ghrelinu stimulují syntézu NPY v mozku, což

obratem stimuluje příjem potravy (Gil-Campos et al., 2006). My jsme zjistili u pacientek s AN i BN během postprandiální doby zvýšené hladiny plazmatického NPY a snížené hladiny ghrelinu. Neprokázali jsme tedy, že u těchto pacientek existuje přímá zpětná vazba mezi ghrelinem a NPY. To by mohlo napovídat, že zvýšené bazální plazmatické hladiny NPY nejsou v přímém vztahu k tělesné hmotnosti a BMI, ale spíše k onemocnění poruchou příjmu potravy jako takovému. Silná pozitivní korelace mezi NPY a obestatinem a slabší, ale stále významná pozitivní korelace mezi NPY a ghrelinem potvrzuje předpoklad, že obestatin může ovlivňovat chuť k jídlu a jídelní chování odlišně od ghrelinu.

5.4 Studie IV: Plazmatické hladiny hormonů po konzumaci sacharidové a proteinové snídani u pacientek s AN a BN

V této studii jsme sledovali plazmatické reakce ghrelinu, obestatinu, NPY a PYY po konzumaci sacharidové a proteinové snídani u pacientek s AN, BN a zdravých žen. Pacientky s AN i BN měly zvýšené bazální hladiny obestatinu, zatímco bazální hladiny ghrelinu byly zvýšené pouze u pacientek s AN, což je v souladu s naším předchozím výzkumem. Postprandiálně plazmatické hladiny ghrelinu poklesly po obou typech snídani u všech sledovaných skupin. Nalezli jsme odlišnou odpověď ghrelinu po podání sacharidové a proteinové snídani u skupin pacientek s AN a BN, u zdravých žen se však celkový průběh hormonu v čase po podání obou snídani nelišil. Plazmatické hladiny obestatinu také poklesly po obou typech snídani u všech sledovaných skupin. U pacientek s AN nebyl nalezen významný rozdíl v reakci obestatinu na konzumaci sacharidové a proteinové snídani, zatímco u pacientek s BN a zdravých kontrol byla reakce obestatinu na snídani odlišná.

Naše výsledky pro bazální hladiny ghrelinu a obestatinu u pacientek s AN a zdravých kontrol jsou v souladu s nálezy ostatních autorů (Germain et al. 2009, Nakahara et al. 2007, Harada et al. 2008). Monteleone et al. (2008) objevili zvýšené plazmatické hladiny obestatinu u pacientek s AN, zatímco u pacientek s BN byly hladiny obestatinu srovnatelné se zdravými kontrolami (Monteleone et al., 2008). V našem předchozím výzkumu jsme ukázali, že u zdravých žen plazmatické hladiny ghrelinu a obestatinu klesají po konzumaci sacharidové snídani (Sedláčková et al., 2008), a tyto reakce ghrelinu a obestatinu byly potvrzeny také pro pacientky s AN a BN (Sedláčková et al., 2011). Porovnání odpovědí hormonů na sacharidovou a proteinovou snídani potvrdilo odlišné

reakce ghrelinu v čase na typ nutrientu u pacientek s AN a BN, zatímco u obestatinu se reakce pacientek s AN na typ nutrientu v čase nelišila. Při porovnání skupin pacientek s AN, BN a zdravých žen mezi sebou jsme zjistili, že reakce obestatinu na příjem potravy se statisticky nelišily u pacientek s AN, BN a zdravých kontrol, rozmezí hodnot obestatinu však byla významně odlišná. Naopak odpovědi ghrelinu na konzumaci snídání se mezi skupinami lišily.

Neurony NPY v hypotalamickém nucleus arcuatus zachycují a propojují periferní a centrální signály, včetně ghrelinu a leptinu, a NPY tak zastává hlavní úlohu při stimulaci příjmu potravy a řízení energetické homeostázy (Kohno et al., 2007). My jsme našli plazmatické hladiny NPY již při předchozím výzkumu významně vyšší u pacientek s AN a BN, při porovnání se zdravými ženami (Beranová et al., 2009; Sedláčková et al., 2011), a naše současná data pro NPY potvrzují výsledky našich předchozích studií. Postprandiálně se reakce hormonu v čase významně nelišily v reakci na sacharidovou a proteinovou snídání u žádné ze sledovaných skupin, jak ukázalo statistické zpracování dat, u pacientek s BN i zdravých kontrol se však lišila rozmezí hodnot hormonu po jednotlivých snídaních. Celková analýza pro všechny skupiny ukázala, že reakce plazmatického NPY se po konzumaci snídání nelišila mezi sledovanými skupinami. Dosud nebyla publikována žádná studie, která by uváděla odpověď na proteinové a sacharidové jídlo u zdravých žen ani u pacientek s AN nebo BN, nemáme tedy možnost porovnat naše výsledky s dalšími studiemi. Plazmatické hladiny leptinu jsme našli významně nižší u pacientek s AN i BN, což souvisí s nižší hmotou tukové tkáně u těchto pacientek a je to v souladu s předchozími výzkumy, že hladiny leptinu v krevním oběhu odrážejí stav energetických zásob organismu. Pacientky s AN měly nižší hladiny leptinu oproti pacientkám s BN i zdravým ženám. Postprandiálně nedošlo v hladinách leptinu k žádným změnám po sacharidové ani proteinové snídání u pacientek s AN a BN ani u zdravých žen.

Plazmatické hladiny PYY v krevním oběhu jsou při hladovění nízké a postprandiálně se rychle zvyšují, přičemž jsou do oběhu uvolňovány dvě formy, PYY1-36 a PYY3-36. Předpokládá se, že periferní PYY3-36 funguje jako signál sytosti, který řídí ukončení jednotlivých jídel, částečně snížením produkce hlad navozujícího peptidu ghrelinu (Batterham et al., 2003; Monteleone et al., 2005). My jsme v našem výzkumu zjistili srovnatelné bazální hladiny PYY u pacientek s AN, BN a zdravých kontrol. Naše data ohledně bazálních hladin PYY jsou v souladu se studiemi Monteleona et al. (2008) a

Stocka et al. (2005), kde našli autoři srovnatelné hladiny PYY u pacientek s BN a zdravých žen, které byly oznámeny i v počátečních studiích týkajících se PYY (Berrettini et al, 1988; Kaye et al., 1990). Naopak jsou naše výsledky nesouladu s výsledky porovnání více studií, které dělal Prince et al. (2009), a kde pacienti s poruchami příjmu potravy měli vyšší bazální koncentrace PYY a ghrelinu (Prince et al., 2009). Dále jsme zjistili zvýšení v postprandiálních plazmatických hladinách PYY u pacientek s AN i BN po sacharidové i proteinové snídani, po proteinové snídani však dosahovaly plazmatické hladiny PYY mnohem vyšších hodnot než u zdravých žen. To napovídá o silném vlivu typu nutrientu na postprandiální uvolňování PYY u pacientek s AN a BN. Tyto výsledky jsou částečně v souladu se studií Nakahary et al. (2007), ve které byly plazmatické hladiny PYY3-36 zvýšené po konzumaci standardního jídla u pacientek s AN i zdravých kontrol (Nakahara et al. 2007). V nedávné době dvě studie nezávisle na sobě oznámily narušenou odpověď PYY3-36 na příjem potravy u žen se symptomatickou BN společně se sníženou odpovědí ghrelinu (Monteleone et al., 2005; Kojima et al., 2005). Obě studie ukázaly negativní korelaci mezi jídlem navozeným zvýšením PYY a poklesem ghrelinu, což potvrzuje negativní vzájemné působení PYY3-36 a ghrelinu. Potlačení cirkulujícího ghrelinu a zvýšení plazmatického PYY3-36 po konzumaci potravy může znamenat vyrovnávací spuštění periferních signálů, zaměřených na ukončení příjmu potravy (Monteleone et al., 2008).

Dále byly hodnoceny korelace mezi statusem poruchy příjmu potravy a sledovanými hormony. Zjistili jsme, že status anorexia nervosa pozitivně koreluje s plazmatickými hladinami ghrelinu, obestatinu, NPY a PYY, a negativně s plazmatickou hladinou leptinu, proto lze předpokládat, že všechny tyto hormony jsou zahrnuty do patologie poruchy příjmu potravy a jejich hladiny jsou u pacientek s AN a BN změněné pravděpodobně jako následek poruchy příjmu potravy. Status bulimia nervosa pozitivně koreloval s plazmatickými hladinami obestatinu, NPY a PYY, a negativně s hladinou leptinu, což naznačuje mnoho společného se statusem anorexia nervosa, přinejmenším co se týče reakcí plazmatických hormonů a narušené regulace energetické rovnováhy.

6 ZÁVĚR

Tato práce sledovala hormony účastníci se řízení příjmu potravy a energetické rovnováhy u pacientek s anorexia nervosa a bulimia nervosa. Hospitalizovaným pacientkám byla podávána sacharidová a proteinová snídaně a byly měřeny bazální plazmatické hladiny hormonů a jejich postprandiální změny po konzumaci snídaně. Naměřené hodnoty hormonů byly porovnány s hodnotami skupiny zdravých žen a také u pacientek s AN a BN vzájemně. Cílem práce bylo přispět k objasnění regulace příjmu potravy u pacientek s AN a BN a zjistit případné odlišnosti v bazálních hladinách hormonů i v reakcích hormonů na příjem potravy s odlišným obsahem nutrientů.

Hlavní závěry práce jsou:

1. Pacientky s AN při zahájení hospitalizace mají zvýšené bazální plazmatické hladiny ghrelinu a NPY a snížené bazální plazmatické hladiny leptinu. Během šestitýdenní léčby se u těchto pacientek společně s nárůstem tělesné hmotnosti plazmatické hladiny ghrelinu a leptinu posouvají směrem k hodnotám zdravých žen, aniž by však těchto hodnot dosáhly. V plazmatických hladinách NPY nedochází během léčby k žádným změnám a jeho hodnoty zůstávají u pacientek s AN vysoké. Hladiny IGF-1 a IGFBP-3 se během šestitýdenní léčby zvyšují až na hodnoty srovnatelné s hodnotami zdravých žen a představují tak citlivé indikátory výživového stavu pacientek s AN.
2. U zdravých žen po konzumaci snídaně s vysokým obsahem sacharidů klesají hladiny plazmatického obestatinu, stejně jako hladiny total ghrelinu a jeho acylované i desacylované formy. Tento nálezní podporuje hypotézu, že ghrelin a obestatin mají během postprandiálního nasycení spíše vzájemně se doplňující úlohu, než funkci antagonistickou.
3. Pacientky s AN mají zvýšené bazální hladiny ghrelinu i obestatinu, zatímco pacientky s BN mají hladiny ghrelinu srovnatelné se zdravými ženami, ale hladiny obestatinu jsou i u nich zvýšené. Po konzumaci snídaně s vysokým obsahem sacharidů dochází u pacientek s AN a BN k poklesu v hladinách ghrelinu i obestatinu, a postprandiální hodnoty obou hormonů jsou v celém svém průběhu zvýšené oproti zdravým ženám. Poměr ghrelin/obestatin je u pacientek s BN nižší než u pacientek s AN a zdravých žen. Pacientky s BN mají zvýšené bazální hodnoty NPY, stejně jako pacientky s AN. Postprandiálně nedochází v hladinách NPY u pacientek s AN a BN k žádným změnám.

4. Hladiny plazmatického ghrelinu postprandiálně klesají po konzumaci sacharidové i proteinové snídani u pacientek s AN, BN i zdravých kontrol. U pacientek s AN i BN je reakce ghrelinu na sacharidovou a proteinovou snídani v čase odlišná, zatímco u zdravých žen se reakce ghrelinu na snídani neliší. Hladiny obestatinu postprandiálně klesají u pacientek i zdravých žen a reakce na konzumaci sacharidové a proteinové snídani se u pacientek s AN neliší, zatímco u pacientek s BN a zdravých žen je reakce odlišná. Reakce plazmatického NPY na konzumaci sacharidů a proteinů se v čase neliší u pacientek s AN, BN ani zdravých žen. Hladiny leptinu jsou u pacientek s AN a BN sniženy a postprandiálně se nemění ani po jedné snídani, stejně jako u zdravých žen. Bazální hladiny PYY jsou srovnatelné u pacientek s AN, BN i zdravých žen. Reakce PYY na konzumaci sacharidové a proteinové snídani je u pacientek s AN a BN významně odlišná, než u zdravých žen. Hladiny PYY dosahují u pacientek s AN a BN o mnoho vyšších hodnot po proteinové snídani než po sacharidové, což naznačuje důležitou úlohu typu nutrientu na postprandiální uvolňování tohoto hormonu u pacientek s AN a BN.

Souhrnně lze konstatovat, že bazální hladiny obestatinu a NPY jsou zvýšené u pacientek s AN a BN a mohly by tak být důležitými ukazateli poruch příjmu potravy. Postprandiální reakce ghrelinu a PYY na podání snídani se liší mezi sledovanými skupinami a úloha těchto hormonů tak zřejmě může být přizpůsobena v závislosti na aktuálním stavu onemocnění poruchou příjmu potravy.

Seznam použité literatury

Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR (1985). Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*. 89:1070–7.

Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86:4753–4758.

Arosio M, Ronchi CL, Beck-Peccoz P, Gebbia C, Giavoli C, Cappiello V, Conte D, Peracchi M (2004). Effects of modified sham feeding on ghrelin levels in healthy human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89(10):5101–4.

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin (2001). *Gastroenterology*. 120(2):337–45.

Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M (2005). Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*. 54(1):18–24.

Bang AS, Soule G, Yandle T, Richards A, Pemberton J (2007). Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma. *Journal of Endocrinology*. 192:313–323.

Baranowska, B.; Wasilewska-Dziubinska, E.; Radzikowska, M.; Plonowski, A.; Roguski, K (1997). Neuropeptide Y, galanin and leptin release in obese women and in women with anorexia nervosa. *Metabolism*. 46:1384–1389.

Baranowska B, Wolinska-Witort E, Wasilewska-Dziubinska E, Roguski K, Chmielowska M (2001). Plasma leptin, neuropeptide Y (NPY) and galanin concentrations in bulimia nervosa and in anorexia nervosa. *Neuro Endocrinology Letters*. 22(5):356–8.

Batterham RL, Bloom SR (2003). The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Ann N Y Acad Sci*. 994:162–8.

Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, Le Roux CW, Thomas EL, Bell JD, Withers DJ (2006). Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metabolism*. 4(3):223–33.

Baumann A, Heitmann S, Bubendorff V, Himmerich H. Laboratory changes in anorexia nervosa (2010). *Praxis (Bern 1994)*. 99(11):661–7.

Beck B (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Phil. Trans. R. Soc. B* 361:1159–1185.

Beranová L, Sedláčková D, Kopecková J, Hainer V, Papezová H, Kvasnicková H, Nedvídková J (2009). Plazmatické hladiny neuropeptidu Y, ghrelinu a leptinu u pacientek s anorexiou nervosa a jejich změny po šestitýdenní realimentaci. *Vnitřní lékařství*. 55(10):925-928.

Berrettini WH, Kaye WH, Gwirtsman H, Allbright A. Cerebrospinal fluid peptide YY immunoreactivity in eating disorders (1988). *Neuropsychobiology*. 19:121-4.

Bowen J, Noakes M, Clifton PM. Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake (2006). *Clin Endocrinol Metab*. 91(8):2913-9.

Blom, W.A.; Stafleu, A.; De Graaf, C.; Kok, F.J.; Schaafsma, G.; Hendriks, H.F. (2005). Ghrelin response to carbohydrate-enriched breakfast is related to insulin. *The American journal of clinical nutrition*. 81:367-375.

Blom WA, de Graaf C, Lluch A, Stafleu A, Schaafsma G, Hendriks HF (2009). Postprandial ghrelin responses are associated with the intermeal interval in time-blinded normal weight men, but not in obese men. *Physiol Behav*. 96(4-5):742-8.

Brewerton TD, Lesem MD, Kennedy A, Garvey WT. Reduced plasma leptin concentrations in bulimia nervosa (2000). *Psychoneuroendocrinology*. 25:649-58.

Broglio, F.; Gottero, C.; Van Koetsveld, P.; Prodam, F.; Destefanis, S.; Benso, A.; Gauna, C.; Hofland, L.; Arvat, E.; Van Der Lely, A.J.; Gigo, E. (2004). Acetylcholine regulates ghrelin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89:2429-2433.

Bronský J, Nedvídková J, Schmidtová J et al. (2004). Ghrelin, leptin, IGF-I, IGF BP3 and their relationship in girls with mental anorexia before and after realimentation. *J Pediatr Gastroenter Nutr*. 39:S74.

Bronsky J, Nedvídková J, Krasnicánová H, Veselá M, Schmidtová J, Koutek J, Kellermayer R, Chada M, Kabelka Z, Hrdlická M, Nevoral J, Prusa R (2011). Changes of orexin A plasma levels in girls with anorexia nervosa during eight weeks of realimentation. *Int J Eat Disord*. 44(6):547-52.

Cáp J (2002). Ghrelin and anorexia nervosa. *Vnitř Lek*. 48(10):919-20.

Carlini, V.P.; Schioth, H.B.; Debariogli, S.R (2007). Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 352:907-912.

Casanueva, F.F.; Diegez, C.; Popovic, V.; Peino, R.; Considine, R.; Caro, J. (1997). Serum immunoreactive leptin concentrations in patients with anorexia nervosa before and after partial weight recovery. *Biochemical and Molecular Medicine* 60, 116-120.

- Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G (2001). Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(4):1738-45.
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology.* 115(1):427-9.
- Coiro V, Saccani-Jotti G, Rubino P, Manfredi G, Melani A, Chiodera P (2006). Effects of ghrelin on circulating neuropeptide Y levels in humans. *Neuro Endocrinol Lett.* 27(6):755-7.
- Counts DR, Gwirtsman H, Carlsson LM, Lesem M, Cutler GB Jr (1992). The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab.* 75(3):762-7.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 411(6836):480-4.
- Cummings, D.E.; Purnell, J.Q.; Frayo, R.S.; Schmidova, K.; Wisse, B.E.; Weigle, D.S.(2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes.* 50:1714–1719.
- Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D (2004). Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287(2):E297–304.
- Cummings DE (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav.* 89(1):71–84.
- Dardennes RM, Zizzari P, Tolle V, Foulon C, Kipman A, Romo L, Iancu-Gontard D, Boni C, Sinet PM, Thérèse Bluet M, Estour B, Mouren MC, Guelfi JD, Rouillon F, Gorwood P, Epelbaum J (2007). Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. *Psychoneuroendocrinology.* 32(2):106-13.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 141(11):4255–61.
- De Smet, B.; Thijs, T.; Peeters, T.L.; Depoortere, I. (2007). Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. *Neurogastroenterology and Motility.* 19:211–217.

Druce MR, Small CJ, Bloom SR. Minireview (2004). Gut peptides regulating satiety. *Endocrinology*. 145:2660–5.

Engineer and Garcia JM. *International Journal of Peptides* (2012). Volume 2012, Article ID 287457, 13 pages. Epub ahead of print.

Erdmann, J.; Töpsch, R.; Lippl, F.; Gussmann, P.; Schusdziarra, V. (2004). Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin and glucose. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89:3048–3054.

Escobar, L.; Freire, J.M.; Espinosa, R. Pajares, M.; Girón, J.A.; Vázquez, J.M.; Chover, A.; Carrasco, M.; Ortero, J.; Gavilán, I.; Segura, E.; Aguilar, M. (2002). Determination of insulin, leptin and neuropeptide Y by radioimmunoanalysis in patients with morbid obesity and anorexia nervosa after therapeutic intervention. *Revista española de medicina nuclear* 21, 3–11.

Friedman, J.M. (2002). The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutrition Reviews*. 60:S1–S14.

Gale S, Castracane D, Mantzoros CH. (2004). Energy homeostasis, Obesity and Eating Disorders: Recent Advances in Endocrinology. *J. Nutr*. 134:295-298.

Ganong WF (1995). *Přehled lékařské fyziologie*. Nakladatelství a vydavatelství H a H.

Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJ, Abribat T, van Koetsveld P, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ (2004). Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 89(10):5035-42.

Gendall KA, Kaye WH, Altemus M, McConaha CW, La Via MC (1999). Leptin, neuropeptide Y, and peptide YY in long-term recovered eating disorder patients. *Biol Psychiatry*. 46(2):292-9.

Germain, N.; Galusca, B.; Grouselle, D.; Frere, D.; Tolle, V.; Zizzari, P.; Lang, F.; Epelbaum, J.; Estour, B. (2009). Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: Constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*. 34:413–419.

Gil–Campos, M.; Aguilera, C.M.; Canete, R.; Gil, A. (2006). Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *British journal of nutrition*. 96:201–226.

Glass MJ, Cleary JP, Billington CJ, Levine AS (1997). Role of carbohydrate type on diet selection in neuropeptide Y-stimulated rats. *Am J Physiol*. 273(6 Pt 2):R2040-5.

Goto M, Arima H, Watanabe M, Hayashi M, Banno R, Sato I, Nagasaki H, Oiso Y. Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures (2006). *Endocrinology* 147:5102–5109.

- Gourcerol, G.; Million, M.; Adelson, D.W.; Wang, Y.; Wang, L.; Rivier, J.; St-Pierre, D.H.; Tache Y. (2006). Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides*. 27:2811–2819.
- Gourcerol G, Taché Y. Obestatin - a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility. (2007). *Neurogastroenterol Motil*. 19(3):161–5.
- Gourcerol G, St-Pierre DH, Taché Y. (2007). Lack of obestatin effects on food intake: should obestatin be renamed ghrelin-associated peptide (GAP)? *Regul Pept*. 141(1–3):1–7.
- Gao XY, Kuang HY, Liu XM, Wang XY, Pan YH, Ma XX. (2008). Decreased obestatin in plasma in metabolically obese, normal-weight men with normal glucose tolerance. *Diabetes research and clinical practice*. 79:e5–6.
- Guo, Z.F.; Zheng, X.; Qin, Y.W.; Hu, J.Q.; Chen, S.P.; Zhang, Z. (2007). Circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio is increased in human obesity *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 92:1875–1880.
- Halaas, J.L.; Gajiwala, K.S.; Maffei, M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T.; Rabinowitz, D.; Lallone, R.L.; Burley, S.K.; Friedman, J.M. (1995). Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the ob gene. *Science*. 269: 543–546.
- Haluzík, M.; Papežová, H.; Nedvídková, J.; Kábrt, J. (1999). Serum leptin levels in patients with anorexia nervosa before and after partial refeeding, relationships to serum lipids and biochemical nutritional parameters. *Physiological Research*. 48:197–202.
- Haluzík M, Kábrt J, Nedvídková J, Svobodová J, Kotrlíková E (1999). Serum leptin levels in female patients with protein-caloric malnutrition and its relation to biochemical indicators of nutritional status. *Vnitr Lek*. 45(4):202–5.
- Harada, T.; Nakahara, T.; Yasuhara, D.; Kojima, S.; Sagiya, K.I.; Amitani, H.; Lavianoc, A.; Naruob, T.; Inuia, A. (2007). Obestatin, acyl ghrelin, and des-acyl ghrelin responses to an oral glucose tolerance test in the restricting type of anorexia nervosa. *Biological Psychiatry*. 63:2, 245–247.
- Hebebrand J, Muller TD, Holtkamp K, Herpertz-Dahlmann B (2007). The role of leptin in anorexia nervosa: clinical implications. *Mol Psychiatry*. 12:23–35.
- Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Murakami N. (2002). Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol*. 173(2):239–45.
- Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*. 23(12):2283–306.
- Holst, B.; Egerod, K.L.; Schild, E.; Vickers, S.P.; Cheetham, S.; Gerlach, L.O.; Storjohann, L.; Stidsen, C.E.; Jones, R.; Beck-Sickinger, A.G.; Schwartz, T.W.: GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. (2007). *Endocrinology* 148, 13–20

- Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. (2002). Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Mol Interv.* 2(8):494–503.
- Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. (2006). Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci.* 100(5):398–410.
- Hotta M, Ohwada R, Katakami H, Shibasaki T, Hizuka N, Takano K. Plasma levels of intact and degraded ghrelin and their responses to glucose infusion in anorexia nervosa. (2004). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 89(11):5707–12.
- Hotta M, Fukuda I, Sato K, Hizuka N, Shibasaki T, Takano K (2000). The relationship between bone turnover and body weight, serum insulin-like growth factor (IGF) I, and serum IGF-binding protein levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(1):200-6.
- Chartrel, N.; Alvear-Perez, R.; Leprince, J.; Iturrioz, X.; Reaux–Le Goazigo, A.; Audinot, V.; Chomarat, P.; Coge, F.; Nosjean, O.; Rodriguez, M.; Galizzi, J.P.; Boutin, J.A.; Vaudry, H.; Llorens–Cortes, C. (2007). Comment on „Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gen, opposes ghrelin’s effects on food intake“. *Science.* 315:766–779.
- Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, Qiu J, Rubinstein M, Rønnekleiv OK, Low MJ, Kelly MJ (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology.* 144(4):1331-40.
- Inui K, Terada T (1999). Dipeptide transporters. *Pharm Biotechnol.* 12:269-88.
- Janas-Kozik M, Krupka-Matuszczyk I, Malinowska-Kolodziej I, Lewin-Kowalik J (2007). Total ghrelin plasma level in patients with the restrictive type of anorexia nervosa. *Regul Pept.* 140(1–2):43–6.
- Jimerson DC, Wolfe BE, Carroll DP, Keel PK. Psychobiology of purging disorder: reduction in circulating leptin levels in purging disorder in comparison with controls. (2010). *Int J Eat Disord.* Nov 1;43(7):584-8.
- Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(23):10931–5.
- Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K, Hosoda K, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001). Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(10):4984-90.
- Kaye WH, Berrettini W, Gwirtsman H, George DT. Altered cerebrospinal fluid neuropeptide Y and peptide YY immunoreactivity in anorexia and bulimia nervosa. (1990). *Archives of general psychiatry.* 47:548–56.
- Koda S, Date Y, Murakami N, Shimbara T, Hanada T, Toshinai K, Niiijima A, Furuya M, Inomata N, Osuye K, Nakazato M. (2005). The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36 - induced feeding reduction in rats. *Endocrinology.* 146:2369–75.

- Kohno D, Nakata M, Maekawa F, Fujiwara K, Maejima Y, Kuramochi M, Shimazaki T, Okano H, Onaka T, Yada T (2007). Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology*. 148(5):2251–63.
- Kojima S, Nakahara T, Nagai N, Muranaga T, Tanaka M, Yasuhara D, Masuda A, Date Y, Ueno H, Nakazato M, Navuo T. (2005). Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clinical Endocrinology* 62:74–78.
- Kolaczynski, J.W.; Ohannesian, J.P.; Considine, R.V.; Marco, C.C.; Opentanova, I.; Nyce, M.R.; Myint, M.; Caro, J.F. (1996). Response of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45. 1511–1515.
- Konturek PC, Konturek JW, Cześniakiewicz–Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek SJ. (2005). Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. Suppl 6:5–25.
- Kos K, Harte AL, James S, Snead DR, O'Hare JP, McTernan PG, Kumar S (2007). Secretion of neuropeptide Y in human adipose tissue and its role in maintenance of adipose tissue mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293(5):E1335–40.
- Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402:656–660.
- Kojima, M.; Hosoda, H.; Matsuo, H.; Kangawa, K. (2001). Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 12:118–122.
- Kojima S, Nakahara T, Nagai N, Muranaga T, Tanaka M, Yasuhara D, Masuda A, Date Y, Ueno H, Nakazato M, Navuo T (2005). Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clin Endocrinol*. 62:74–8.
- Kojima, M.; Kangawa, A.K (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*. 85:495–522.
- Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB (2001). Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine*. (1):101–4.
- Kos K, Harte AL, James S, Snead DR, O'Hare JP, McTernan PG, Kumar S. (2007). Secretion of neuropeptide Y in human adipose tissue and its role in maintenance of adipose tissue mass *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293:E1335–E1340.
- Krch FD (2005). *Poruchy příjmu potravy*. Grada, 255 s.
- Krsek M, Rosická M, Haluzík M, Papezová H, Krízová J, Justová V, Lacinová Z, Jarkovská Z. (2002). The changes in serum ghrelin levels and their relationship to IGF-I, its binding proteins and leptin in women patients with anorexia nervosa. *Vnitřní lékařství*. 48(10):948–51.

Krykorková I, Nedvídková J (2003). Recently discovered hormones with a role in energy homeostasis. *Časopis Lékařů Českých*. 142(2):80-3.

Larhammar D (1996). Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory Peptides*. 65(3):165-74.

Lagaud GJ, Young A, Acena A, Morton MF, Barrett TD, Shankley NP. (2007). Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun*. 357:264–269.

Lee, G.H.; Proenca, R.; Montez, J.M.; Carroll, K.M.; Darvishzadeh, J.G.; Lee, J.I.; Friedman, J.M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632–635.

Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr (2002). Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*. 143(1):185–90.

Lely Van Der, A.J.; Tschöp, M.; Heiman, M.L.; Ghigo, E. (2004). Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews*. 25:3, 426–457.

Lu, H.; Li, C. (2000). Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Research* 10, 81–9.

Mantzoros, Ch.; Flier, J.S.; Lesem, M.D.; Brewerton, T.D.; Jimerson, D.C. (1997). Cerebrospinal fluid leptin levels in anorexia nervosa: correlation with nutritional status and potential role in resistance to weight gain. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 82:1845–1851.

Margetic, S.; Gazzola, C.; Pegg, G.G.; Hill, R.A.: Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. (2002). *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 26:1407–1433.

Marzullo, P.; Caumo, A.; Savia, G.; Verti, B.; Walker, G.E.; Maestrini, S.; Tagliaferri, A.; Di Blasio, A.M.; Liuzzi, A. (2006). Predictors of postabsorptive ghrelin secretion after intake of different macronutrients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 91:4124–4130.

Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. (2000). Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 276(3):905–8.

Minokoshi, Y.; Kim, Y.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 415:339–343.

Misra M, Miller KK, Tsai P, Gallagher K, Lin A, Lee N, Herzog DB, Klibanski A. (2006). Elevated peptide YY levels in adolescent girls with anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 91:1027–33.

Monteleone, P.; Di Lietto, A.; Tortorella, A.; Longobardi, N.; Maj, M. (2000). Circulating

leptin in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa or binge-eating disorder: relationship to body weight eating patterns, psychopathology and endocrine changes. *Psychiatry research*. 94:121–129.

Monteleone P, Bortolotti F, Fabrazzo M, La Rocca A, Fuschino A, Maj M (2000). Plasma leptin response to acute fasting and refeeding in untreated women with bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:2499–503.

Monteleone P, Martiadis V, Colurcio B, Maj M. (2002). Leptin secretion is related to chronicity and severity of the illness in bulimia nervosa. *Psychosomatic Medicine*. 64(6):874–9.

Monteleone, P.; Bencivenga, R.; Longobardi, N.; Serritella, C.; Maj, M. (2003). Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88:5510–5514.

Monteleone P, DiLieto A, Castaldo E, Maj M. (2004). Leptin functioning in eating disorders. *CNS Spectr*. 9:523–9.

Monteleone P, Fabrazzo M, Tortorella A, Martiadis V, Serritella C, Maj M. (2005). Circulating ghrelin is decreased in non-obese and obese women with binge eating disorder as well as in obese non-binge eating women, but not in patients with bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*, 30(3):243–50.

Monteleone P, Martiadis V, Rigamonti AE, Fabrazzo M, Giordani C, Muller EE, Maj M. (2005). Investigation of peptide YY and ghrelin responses to a test meal in bulimia nervosa. *Biological Psychiatry*. 57:926–31.

Monteleone, P.; Serritella, C.; Martiadis, V.; Scognamiglio, P.; Maj, M. (2008). Plasma obestatin, ghrelin and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93:11, 4418–4421.

Monteleone P., Castaldo E., Maj M. (2008). Neuroendocrine dysregulation of food intake in eating disorders. *Regulatory Peptides*: 149: 39–50.

Muccioli, G.; Tschöp, M.; Papotti, M.; Deghenghi, R.; Heiman, M.; Ghigo, E. (2002). Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology* 440, 235–254.

Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K. (2001). Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(12):5854–9.

Nakahara T, Kojima S, Tanaka M, Yasuhara D, Harada T, Sagiya K, Muranaga T, Nagai N, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T, Inui A. (2007). Incomplete restoration of the secretion of ghrelin and PYY compared to insulin after food ingestion following weight gain in anorexia nervosa. *Journal of psychiatric research*. 41:814–820.

Nakahara, T.; Harada, T.; Yasuhara, D.; Shimada, N.; Amitani, H.; Sakoguchi, T.;

- Kamiji, M.M.; Asakawa, A.; Inui, A.: Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. (2008). *Biological Psychiatry*. 64:252–255.
- Nakai, Y.; Hosoda, H.; Nin, K.; Ooya, C.; Hayashi, H.; Akamizu, T.; Kangawa, K. (2004). Short-term secretory regulation of the active form of ghrelin and total ghrelin during an oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *European journal of endocrinology*. 150:913–914.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 409(6817):194–8.
- Nakazato M, Hashimoto K, Shiina A, Koizumi H, Mitsumoti M, Imai M, Shimizu E, Iyo M. (2004). No changes in serum ghrelin levels in female patients with bulimia nervosa. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 28:1181–1184.
- Nedvídková J, Kryrková I, Barták V, Papežová H, Gold PW, Alesci S, Pacak K. (2003). Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88:1678–82.
- Nedvídková, J.; Nedvídek, J. (2007). Ghrelin a další hormony příjmu potravy a energetické rovnováhy. In: *Pokroky v endokrinologii*. Stárka, L. a kolektiv. Maxdorf.
- Nogueiras, R.; Pfluger, P.; Tovar, S.; Arnold, M.; Mitchell, S.; Morris, A.; Perez-Tilve, D.; Vazquez, M.J.; Wiedmer, P.; Castaneda, T.R.; DiMarch, R.; Tschöp, M.; Schurmann, A.; Joost, H.G.; Williams, L.M.; Langhans, W.; Dieguez, C. (2007). Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology*. 148, 21–26.
- Oświecimska J, Ziora K, Geisler G, Broll-Waśka K (2005). Prospective evaluation of leptin and neuropeptide Y (NPY) serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett*. 26(4):301–4.
- Otto, B.; Cuntz, U.; Fruehauf, E.; Wawarta, R.; Folwaczny, C.; Riepl, R.L.; Heiman, M.L.; Lehnert, P.; Fichter, M.; Tschöp, M. (2001). Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology* 145. 669–673.
- Otto, B.; Tschöp, M.; Frühauf, E.; Heldwein, W.; Fichter, M.; Otto, C.; Cuntz, U. (2005). Postprandial ghrelin release in anorectic patients before and after weight gain. *Psychoneuroendocrinology*. 30:577–581.
- Papežová H (2004). Poruchy příjmu potravy. In *Psychiatrie*, Höschl, Libiger, Švestka, editoři. Tigris, s. 609–620.
- Pfaff, D.W., Philips M.I., Rubin, R.T. (2004). *Principles of Hormone/behavior relation*. Elsevier Academic press.

Prince AC, Brooks SJ, Stahl D, Treasure J (2009). Systematic review and meta-analysis of the baseline concentrations and physiologic responses of gut hormones to food in eating disorders. *Am J Clin Nutr.* 89(3):755–765.

Reinehr T, de Sousa G, Roth CL. Obestatin and ghrelin levels in obese children and adolescents before and after reduction of overweight (2008). *Clin Endocrinol (Oxf).* 68(2):304-10.

Rosická, M.; Kršek, M.; Matoulek, M.; Jarkovská, Z.; Marek, J.; Justová, V.; Lacinová, Z. (2003). Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiological Research.* 52:61–66.

Saladin, R.; De Vos, P.; Guerre-Milo, M (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527–529.

Sainsbury A, Cusin I, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B (1996). Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats increases obese gene expression in white adipose tissue. *Diabetologia.* 39(3):353-6.

Samson, W.K.; White, M.M.; Price, C.; Ferguson, A.V. (2007). Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *The American Journal of Physiology.* 292, R637–R643.

Sánchez J, Oliver P, Palou A, Picó C (2004). The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology.* 145(11):5049-55.

Sedláčková, D.; Dostálová, I.; Hainer, V.; Beranová, L.; Kvasničková, H.; Hill, M.; Haluzík, M.; Nedvídková, J. (2008). Simultaneous decrease of plasma obestatin and ghrelin levels after a high-carbohydrate breakfast in healthy women. *Physiological Research.* 57:1, 2 Suppl 1: S 29–37.

Sedlackova D, Kopeckova J, Papezova H, Vybiral S, Kvasnickova H, Hill M, Nedvidkova J (2011). Changes of plasma obestatin, ghrelin and NPY in anorexia and bulimia nervosa patients before and after a high-carbohydrate breakfast. *Physiological Research.* 60(1):165–73.

Seoane, L.M.; Al-Massadi, O.; Pazos, Y.; Fagotto, U.; Casanueva, F.F. (2006). Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *Journal of Endocrinological Investigation.* 29, RC13–RC15.

Shiia, T.; Nakazato, M.; Mizuta, M.; Date, Y.; Mondal, M.S.; Tanaka, M.; Nozoe, S.; Hosoda, H.; Kangawa, K.; Matsukara, S. (2002). Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 87:240–244.

Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J (2004). Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr.* 144(1):36–42.

Stanley BG, Daniel DR, Chin AS, Leibowitz SF (1985). Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides*. 6(6):1205-11.

Stanley BG, Anderson KC, Grayson MH, Leibowitz SF (1989). Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiology and Behaviour* 46(2):173-7.

Stock S, Lechner P, Wong AC, Ghatei MA, Kieffer TJ, Bloom SR, Chanoine JP. (2005). Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 90:2161–8.

St-Pierre, D.H.; Karelis, A.D.; Cianflone, K.; Conus, F.; Mignault, D. (2004). Rabasa-Lhoret, R.; Stong, M.; Tremblay-Lebeau, A.A.; Poehleman, E.T.: Relationship between ghrelin and energy expenditure in healthy young women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89:12,5993–5997.

Svobodová J, Haluzík M, Papežová H et al. (1999). Vliv částečné realimentace na sérové koncentrace leptinu a klidový energetický výdej u pacientek s mentální anorexií. *Časopis Lékařů Českých*. 24:748-752.

Tagami T, Satoh N, Usui T, Yamada K, Shimatsu A, Kuzuya H (2004). Adiponectin in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *JCEM*. 89(4): 1833–1837.

Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S (2002). Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol*. 146(6):R1-3.

Tanaka, M.; Tatebe, Y.; Nakahara, T.; Yasuhara, D.; Sagiya, K.; Muranaga, T.; Ueno, H.; Nakazato, M.; Nozoe, S.; Naruo, T. (2003). Eating pattern and the effect of oral glucose on ghrelin and insulin secretion in patients with anorexia nervosa. *Clinical endocrinology*. 59:574–579.

Tanaka M, Nakahara T, Kojima S, Nakano T, Muranaga T, Nagai N, Ueno H, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T (2004). Effect of nutritional rehabilitation on circulating ghrelin and growth hormone levels in patients with anorexia nervosa. *Regul Pept* 122(3):163–168.

Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*. 145(1):234-42.

Tolle, V.; Kadem, M.; Bluet-Pajot, M.T.; Frere, D.; Foulon, C.; Bossu, C.; Dardennes, R.; Mounier, C.; Zizzari, P.; Lang, F.; Epelbaum, J.; Estour, B. (2003). Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88. 109–116.

8. Wajchenberg, B.I. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* 21:697–738.

Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*. 144(4):1506–12.

Tremblay, F.; Perreault, M.; Klama, L.D.; Tobin, J.F.; Smith, E.; Gimeno, R.E. (2007). Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology*. 148: 501–506.

Troisi A, Di Lorenzo G, Lega I, Tesauro M, Bertoli A, Leo R, Iantorno M, Pecchioli C, Rizza S, Turriziani M, Lauro R, Siracusano A. (2005). Plasma ghrelin in anorexia, bulimia, and binge-eating disorder: relations with eating patterns and circulating concentrations of cortisol and thyroid hormones. *Neuroendocrinology*. 81(4):259–66.

Tschöp, M.; Weyer, C.; Tataranni, P.A.; Devanarayan, C.; Casanueva, F.F.; Deghenghi, R.; Camanni, F.; Ghigo E. (2000). Preliminary evidence that ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of Endocrinological Investigation*. 23:493–495.

Tschöp, M.; Wawarta, R.; Riepl, R.L.; Friedrich, S.; Bidlingmayer, M.; Landgraf, R.; Folwaczny, C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*. 24: RC19–21.

Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, Nakazato M (2005). Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regulatory peptides*. 126(1–2):11–9.

Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. (2008). The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept*. 45(1-3):12-6.

Ukkola, O. (2003). Endocrinological activities of ghrelin: new insights. *European journal of internal medicine*. 14:351–356.

Ukkola O (2005). Ghrelin and the metabolic balance. 28(9):849–52.

Vicennati, V.; Genghini, S.; De Iasio, R.; Paqui, F.; Pagotto, U.; Paquali, R. (2007). Circulating obestatin levels and the grelin/obestatin ratio in obese women. *European Journal of Endocrinology*. 157:295–301.

Wabitsch, M.; Jensen, P.B.; Blum, W.F.; Christoffersen, C.T.; Englaro, P.; Heinze, Weikel JC, Wichniak A, Ising M, Brunner H, Friess E, Held K, Mathias S, Schmid DA, Uhr M, Steiger A (2003). *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284(2):E407-15.

Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. (2001). *J Clin Endocrinol Metab*. 86(12):5992–5998.

Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Cao X (2008). Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J.* 22(7):2452–64.

Zamrazilova H, Hainer V, Sedlackova D, Papezova H, Kunesova M, Bellisle F, Hill M, Nedvidkova J. (2008). Plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women. *Physiological Research.* 57: Suppl 1:S49–55.

Zhang, F.; Proenca, M.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold M.; Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425–432.

Zhang, J.V.; Ren, P.G.; Avsian-Kretchmer, O.; Luo, C.W.; Rauch, R.; Klein, C.; Hsueh, A.J. (2005). Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gen, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science.* 310: 996–999.

Zizzari, P.; Longchamps, R.; Epelbaum, J.; Bluet-Pajot, M.T. (2007). Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology:* 148: 1648–1653.

Seznam obrázků

Obr. 1 Vznik acyl ghrelinu – esterifikace kyselinou n-oktanovou

Obr. 2 Vznik ghrelinu a obestatinu

Obr. 3 Vztahy mezi periferními orgány a mozkiem – interakce v regulaci energetické homeostázy

Obr. 4 Protokol pro odběr krve

Přílohy: Tabulky

Tabulka 1 Schéma postupu stanovení ghrelinu

Den 1					Den 2		Den 3	
	1. krok	2.–3. krok	4. krok	5. krok	6. krok	7. krok	8. krok	9.–11. krok
Č. zkumavky	Přidat ředící roztok	Přidat standard/ kontrolu/ vzorek	Přidat ghrelinovou protilátku	Protřepat, přikrýt a inkubovat 20–24 hodin při 4 °C	Přidat ¹²⁵ I-ghrelin	Protřepat, přikrýt a inkubovat 22–24 hod. při 4 °C	Přidat precipitační činidlo	Inkubovat 20 min. při 4 °C, centrifugovat při 4 °C 20 min., odsát supernatant a změřit radioaktivitu precipitátu.
1, 2	---	---	---		100 µl		---	
3, 4	300 µl	---	---		100 µl		1,0 ml	
5, 6	200 µl	---	100 µl		100 µl		1,0 ml	
7, 8	100 µl	100 µl ze zkumavky 6	100 µl		100 µl		1,0 ml	
9, 10	100 µl	100 µl ze zkumavky 5	100 µl		100 µl		1,0 ml	
11, 12	100 µl	100 µl ze zkumavky 4	100 µl		100 µl		1,0 ml	
13, 14	100 µl	100 µl ze zkumavky 3	100 µl		100 µl		1,0 ml	
15, 16	100 µl	100 µl ze zkumavky 2	100 µl		100 µl		1,0 ml	
17, 18	100 µl	100 µl ze zkumavky 1	100 µl		100 µl		1,0 ml	
19, 20	100 µl	100 µl ze standardu	100 µl		100 µl		1,0 ml	
21, 22	100 µl	100 µl z Kontroly 1	100 µl		100 µl		1,0 ml	
23, 24	100 µl	100 µl z Kontroly 2	100 µl		100 µl		1,0 ml	
25–n	100 µl	100 µl z nezn. vzorku	100 µl		100 µl		1,0 ml	

Tabulka 2 Schéma postupu stanovení obestatinu

Den 1					Den 2			Den 3			
	1. krok	2.–3. krok	4. krok	5. krok	6. krok	7. krok	8. krok	9. krok	10. krok	11. krok	12. krok
Č. zkumavky	Přidat ředící roztok	Přidat standard/ vzorek	Přidat primární protilátku	Protřepat, přikrýt a inkubovat při 4 °C 16–24 hodin	Přidat ¹²⁵ I- obestatin	Protřepat, přikrýt a inkubovat 16–24 hod. při 4 °C	Přidat GAR sérum	Přidat NRS sérum	Protřepat a inkubovat při pokojové teplotě 90 min.	Přidat ředící roztok	Protřepat, centrifugovat 20 min. při 4° C (kromě zkumavek č.1a 2), odsát supernatant a změřit radioaktivitu precipitátů.
1, 2	---	---	---		100 µl		---	---		---	
3, 4	200 µl	---	---		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
5, 6	100 µl	---	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
7, 8	---	100 µl ze standardu H	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
9, 10	---	100 µl ze standardu G	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
11, 12	---	100 µl ze standardu F	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
13, 14	---	100 µl ze standardu E	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
15, 16	---	100 µl ze standardu D	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
17, 18	---	100 µl ze standardu C	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
19, 20	---	100 µl ze standardu B	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
21, 22	---	100 µl ze standardu A	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
23, 24	---	100 µl z Kontroly	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
25–n	---	100 µl z nezn. vzorku	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	

Tabulka 3 Schéma postupu stanovení neuropeptidu Y

Den 1					Den 2		Den 3	
	1.–2. krok	3. krok	4. krok	5. krok	6. krok	7. krok	8. krok	9.–11. krok
Č. zkumavky	Přidat standard/ kontrolu/ vzorek	Přidat NPY protilátku	Přidat ředící roztok	Protřepat a inkubovat 18–24 hodin při 2–8 °C	Přidat ¹²⁵ I-NPY	Protřepat a inkubovat 18–24 hodin při 2–8 °C	Přidat dvoufázovou protilátku	Protřepat a inkubovat 30–60 min. při 2–8 °C. Centrifugovat 15 min. při 1700 x g při 4 °C. Odsát supernatant a změřit radioaktivitu precipitátů.
1, 2	---	---	---		200 µl		---	
3, 4	200 µl ze standardu 0	---	200 µl		200 µl		100 µl	
5, 6	200 µl ze standardu 0	200 µl	---		200 µl		100 µl	
7, 8	200 µl ze standardu 9,4	200 µl	---		200 µl		100 µl	
9, 10	200 µl ze standardu 18,8	200 µl	---		200 µl		100 µl	
11, 12	200 µl ze standardu 37,5	200 µl	---		200 µl		100 µl	
13, 14	200 µl ze standardu 75	200 µl	---		200 µl		100 µl	
15, 16	200 µl ze standardu 150	200 µl	---		200 µl		100 µl	
17, 18	200 µl ze standardu 300	200 µl	---		200 µl		100 µl	
19, 20	200 µl z Kontroly 1	200 µl	---		200 µl		100 µl	
21, 22	200 µl z Kontroly 1	200 µl	---		200 µl		100 µl	
23, 24	200 µl z Kontroly 2	200 µl	---		200 µl		100 µl	
25, 26	200 µl z Kontroly 2	200 µl	---		200 µl		100 µl	
27–n	200 µl z nezn. vzorku	200 µl	---		200 µl		100 µl	

Tabulka 4 Schéma postupu stanovení peptidu YY

Den 1					Den 2		Den 3	
	1. krok	2.–3. krok	4. krok	5. krok	6. krok	7. krok	8. krok	9.–11. krok
Č. zkumavky	Přidat ředící roztok	Přidat standard/ kontrolu/ vzorek	Přidat PYY protilátku	Protřepat, přikrýt a inkubovat 20–24 hodin při 4 °C	Přidat ¹²⁵ I-PYY	Protřepat, přikrýt a inkubovat 22–24 hod. při 4 °C	Přidat precipitační činidlo	Inkubovat 20 min. při 4 °C, centrifugovat při 4 °C 20 min., odsát supernatant a změřit radioaktivitu precipitátů.
1, 2	---	---	---		100 µl		---	
3, 4	300 µl	---	---		100 µl		1,0 ml	
5, 6	200 µl	---	100 µl		100 µl		1,0 ml	
7, 8	100 µl	100 µl z 10 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
9, 10	100 µl	100 µl z 20 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
11, 12	100 µl	100 µl ze 40 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
13, 14	100 µl	100 µl z 80 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
15, 16	100 µl	100 µl ze 160 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
17, 18	100 µl	100 µl z 320 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
19, 20	100 µl	100 µl z 640 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
21, 22	100 µl	100 µl z 1280 pg/ml	100 µl		100 µl		1,0 ml	
23, 24	100 µl	100 µl z Kontroly 1	100 µl		100 µl		1,0 ml	
25, 26	100 µl	100 µl z Kontroly 2	100 µl		100 µl		1,0 ml	
27–n	100 µl	100 µl z nezn. vzorku	100 µl		100 µl		1,0 ml	

Tabulka 5 Schéma postupu stanovení leptinu

Den 1						Den 2		
	1. krok	2.–3. krok	4. krok	5. krok	6. krok	7. krok	8. krok	9.–11. krok
Č. zkumavky	Přidat ředící roztok	Přidat standard/ kontrolu/ vzorek	Přidat ¹²⁵ I-leptin	Přidat leptinovou protilátku	Protřepat, přikrýt a inkubovat 20–24 hodin při 4 °C	Přidat precipitační činidlo	Protřepat a inkubovat 20 min. při 4 °C	Centrifugovat při 4 °C 20 min., odsát supernatant a změřit radioaktivitu precipitátů.
1, 2	---	---	100 µl	---		---		
3, 4	300 µl	---	100 µl	---		1,0 ml		
5, 6	200 µl	---	100 µl	100 µl		1,0 ml		
7, 8	100 µl	100 µl z 0,5 ng/ml	100 µl	100 µl		1,0 ml		
9, 10	100 µl	100 µl z 1 ng/ml	100 µl	100 µl		1,0 ml		
11, 12	100 µl	100 µl z 2 ng/ml	100 µl	100 µl		1,0 ml		
13, 14	100 µl	100 µl z 5 ng/ml	100 µl	100 µl		1,0 ml		
15, 16	100 µl	100 µl z 10 ng/ml	100 µl	100 µl		1,0 ml		
17, 18	100 µl	100 µl z 20 ng/ml	100 µl	100 µl		1,0 ml		
19, 20	100 µl	100 µl z 50 ng/ml	100 µl	100 µl		1,0 ml		
21, 22	100 µl	100 µl ze 100 ng/ml	100 µl	100 µl		1,0 ml		
23, 24	100 µl	100 µl z Kontroly 1	100 µl	100 µl		1,0 ml		
25, 26	100 µl	100 µl z Kontroly 2	100 µl	100 µl		1,0 ml		
27, 28	100 µl	100 µl z nezn. vzorku	100 µl	100 µl		1,0 ml		
29–n	100 µl	100 µl z nezn. vzorku	100 µl	100 µl		1,0 ml		

Tabulka 6 Schéma postupu stanovení acyl ghrelinu

	1. krok	2. krok	3–5. krok	6. krok	7.–8. krok	9. krok	10.–11. krok	12. krok	13. krok	14. krok	15. krok
Č. jamky	Naředit 20x promývací pufr 760 ml destilované vody.	Naředit konjugát HRP protilátky HRP ředícím pufrém.	Přidat ředící roztok	Přidat standardy/ kontroly/ vzorky	Přikrýt samolepkou, inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě. Promýt 3x 300 µl promývacího pufru s 1-minutovým namáčením.	Přidat naředěnou HRP protilátku	Přikrýt samolepkou, inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě. Promýt 4x 300 µl promývacího pufru s 1-minutovým namáčením.	Přidat roztok substrátu	Přikrýt samolepkou, inkubovat 30 minut ve tmě při pokojové teplotě.	Přidat zastavující činidlo	Změřit absorbanci při 450 nm během několika minut po zastavení reakce.
A1, A2			200 µl	---		200 µl		200 µl		50 µl	
B1, B2			150 µl	50 µl ze zkum. 6		200 µl		200 µl		50 µl	
C1, C2			150 µl	50 µl ze zkum. 5		200 µl		200 µl		50 µl	
D1, D2			150 µl	50 µl ze zkum. 4		200 µl		200 µl		50 µl	
E1, E2			150 µl	50 µl ze zkum. 3		200 µl		200 µl		50 µl	
F1, F2			150 µl	50 µl ze zkum. 2		200 µl		200 µl		50 µl	
G1, G2			150 µl	50 µl ze zkum. 1		200 µl		200 µl		50 µl	
H1, H2			150 µl	50 µl Standardu		200 µl		200 µl		50 µl	
A3, A4			150 µl	50 µl z Kontroly 1		200 µl		200 µl		50 µl	
B3, B4			150 µl	50 µl z Kontroly 2		200 µl		200 µl		50 µl	
C3, C4			150 µl	50 µl z nezn. vzorku		200 µl		200 µl		50 µl	
D3, D4			150 µl	50 µl z nezn. vzorku		200 µl		200 µl		50 µl	
E3, E4 atd.			150 µl	50 µl z nezn. vzorku		200 µl		200 µl		50 µl	

Tabulka 7 Schéma postupu stanovení desacyl ghrelinu

	1. krok	2. krok	3–5. krok	6. krok	7.–8. krok	9. krok	10.–11. krok	12. krok	13. krok	14. krok	15. krok
Č. jamky	Naředit 20x promývací pufr 760 ml deionizované vody.	Naředit konjugát HRP protilátky HRP ředícím pufrém.	Přidat ředící roztok	Přidat standardy/ kontroly/ vzorky	Přikrýt samolepkou, inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě. Promýt 3x 300 µl promývacího pufru s 1-minutovým namáčením.	Přidat naředěnou HRP protilátku	Přikrýt samolepkou, inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě rotační třepače při 400–500 ot/min. Promýt 4x 300 µl promývacího pufru s 1-minutovým namáčením.	Přidat roztok substrátu	Přikrýt samolepkou, inkubovat 30 minut ve tmě při pokojové teplotě.	Přidat zastavující činidlo	Změřit absorbanci při 450 nm během několika minut po zastavení reakce.
A1, A2			200 µl	---		200 µl		200 µl		50 µl	
B1, B2			150 µl	50 µl ze zkum. 6		200 µl		200 µl		50 µl	
C1, C2			150 µl	50 µl ze zkum. 5		200 µl		200 µl		50 µl	
D1, D2			150 µl	50 µl ze zkum. 4		200 µl		200 µl		50 µl	
E1, E2			150 µl	50 µl ze zkum. 3		200 µl		200 µl		50 µl	
F1, F2			150 µl	50 µl ze zkum. 2		200 µl		200 µl		50 µl	
G1, G2			150 µl	50 µl ze zkum. 1		200 µl		200 µl		50 µl	
H1, H2			150 µl	50 µl Standardu		200 µl		200 µl		50 µl	
A3, A4			150 µl	50 µl z Kontroly 1		200 µl		200 µl		50 µl	
B3, B4			150 µl	50 µl z Kontroly 2		200 µl		200 µl		50 µl	
C3, C4			150 µl	50 µl z nezn. vzorku		200 µl		200 µl		50 µl	
D3, D4			150 µl	50 µl z nezn. vzorku		200 µl		200 µl		50 µl	
E3, E4 atd.			150 µl	50 µl z nezn. vzorku		200 µl		200 µl		50 µl	

Tabulka 8 Hormonální a biochemické charakteristiky pacientek s AN před a po šestitýdenní léčbě a porovnání se skupinou zdravých žen

	AN 1 (n=10)	AN 2 (n=10)	Kontroly (n=10)
Věk (roky)	23,3±1,0	23,3±1,0	24,3±0,8
BMI (kg/m²)	14,74±0,43 * ⁺	17,55±0,39 * ⁺	21,45±0,72
Ghrelin (pg/ml)	2201,38±186* ⁺	1433,33±227* ⁺	980,84±71
Leptin (ng/ml)	1,68±0,35* ⁺	4,45±0,92* ⁺	9,0 ±1,19
NPY (pmol/l)	67,77±7,03*	75,72±7,86*	49,79±6,03
IGF-1 (ng/ml)	248,25±21* ⁺	382,85±32 ⁺	454,10±39
IGFBP-3 (ng/ml)	2779,88±145 * ⁺	3340,85±168 ⁺	3413,79±141

AN 1 – pacientky s anorexia nervosa před léčbou, AN 2 – pacientky s anorexia nervosa po šestitýdenní léčbě, kontroly – kontrolní skupina zdravých žen.

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.

Index * označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN 1, AN 2 a kontrol (p < 0,05).

Index ⁺ označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN 1 a AN 2 (p < 0,05).

Tabulka 9 Plazmatické hladiny obestatinu, total ghrelinu, acyl ghrelinu, desacyl ghrelinu, a NPY před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové snídani u skupiny zdravých žen

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Obestatin (pg/ml)	181±15,3	165±4,76*	159±14,8*	150±17,4*	155±16,9*	162±14,7*
GhreTot (pg/ml)	1053±106	868±83*	865±80,9*	942±110*	850±90,4*	899±88,1*
GhreAcyl (fmol/ml)	11,61±1,54	7,86±1,2*	7,96±1,2	8,95±1,42	11,6±1,94	12,1±1,86
GhreDes (fmol/ml)	95,9±29,5	64,3±15,3*	43,4±7,63*	59,2±11,7*	49,0±8,19*	44,6±11,9*
Ghre/Obest	5,88± 0,50	5,35±0,33	5,52±0,32	6,58±0,95	5,58±0,51	5,60±0,35
NPY (pmol/l)	47,5±7,54	-	42,4±7,26	36,9±6,93*	-	36,7±19,6*

GhreTot – total ghrelin, GhreAcyl – acyl ghrelin, GhreDes – desacyl ghrelin, Ghre/Obest – poměr ghrelin/obestatin, NPY – neuropeptid Y.

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.

Index * označuje signifikantní změnu v hladině hormonu při porovnání s bazální hodnotou ($p < 0,05$).

Tabulka 10 Vztahy mezi obestatinem, total ghrelinem, acyl a desacyl ghrelinem a ostatními hormonálními a antropometrickými parametry u skupiny zdravých žen.

		Obestatin	GhreTot	GhreAc	GhreDes	Ghr/Ob	NPY	BMI
Obestatin	<i>r</i>	-	0,661	0,284	0,460	-0,309	0,805	-0,197
	<i>p</i>	-	0,000	0,068	0,002	0,047	0,000	0,210
GhreTot	<i>r</i>	0,661	-	0,363	0,666	0,414	0,490	-0,048
	<i>p</i>	0,000	-	0,018	0,000	0,006	0,009	0,762
GhreAcyl	<i>r</i>	0,284	0,363	-	0,152	0,033	0,449	-0,266
	<i>p</i>	0,068	0,018	-	0,336	0,836	0,019	0,089
GhreDes	<i>r</i>	0,460	0,666	0,152	-	0,357	0,459	0,093
	<i>p</i>	0,002	0,000	0,336	-	0,020	0,016	0,557
Ghre/Obest	<i>r</i>	-0,309	0,414	0,033	0,357	-	-0,303	0,408
	<i>p</i>	0,047	0,006	0,836	0,020	-	0,124	0,007

GhreTot – total ghrelin, GhreAcyl – acyl ghrelin, GhreDes – desacyl ghrelin, Ghre/Obest – poměr ghrelin/obestatin, NPY – neuropeptid Y.

Data jsou počítána celkově pro všechny časy (0, 30, 60, 90, 120, 150 min).

r = korelační koeficient, *p* = p-value (hodnoty *p* < 0,05 jsou označeny tučným písmem)

Tabulka 11 Antropometrické a biochemické parametry u skupin pacientek s AN, BN a zdravých žen

Variable	AN (n=8)	BN (n=13)	C (n=11)
Věk (roky)	25,4±1,9	22,0±1,05	25,1±1,16
BMI (kg/m ²)	15,8±0,5*	20,1±0,41	20,9±0,40
LBM (%)	87,5±1,2*	74,2±2,3	69,9±2,7
FM (%)	11,9±1,4*	25,3±1,3	29,2±1,6
IGF-1 (ng/ml)	253,42± 33 *	395,77±54	455,76± 41
IGF BP-3 (ng/ml)	2832,54±138*	3286,17±241	3478,56±112

AN – pacientky s anorexia nervosa, BN – pacientky s bulimia nervosa, C – kontrolní skupina zdravých žen, LBM – lean body mass, tukuprostá hmota, FM – fat mass, tuková hmota.

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.

Index * označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN, BN a C ($p < 0,05$).

Tabulka 12 Závislost NPY na ghrelinu, obestatinu a statusu anorexia nervosa a bulimia nervosa

Dependence of NPY on ghrelin, obestatin and on the anorexia and bulimia status as evaluated using multivariate regression (Orthogonal projection to latent stuctures)

Variables		Parameter	95% Confidence interval of the parameter	Parameter/95%CI	Significance of the parameters	Correlation with the common predictive component
NPY	Dependent variable	1,000	0,289	3,47	p<0.01	0,506
Anorexia	Predictors	0,391	0,037	10,66	p<0.01	0,574
Bulimia		0,272	0,099	2,76	p<0.01	0,400
Controls		-0,626	0,085	-7,34	p<0.01	-0,919
Ghrelin		0,318	0,089	3,56	p<0.01	0,467
Obestatin		0,553	0,089	6,22	p<0.01	0,812
Time		-0,065	0,120	-0,54	NS	-0,095
R^2 ^{a)}		25,6%				
Q^2 ^{b)}		23,9%				

^{a)} R^2 is the percent of variation of dependent variable explained by the model. ^{b)} Q^2 is the percent of variation of dependent variable predicted by the model according to cross validation.

R^2 – procento rozptylu závisle proměnné vysvětlené modelem.

Q^2 – procento rozptylu závisle proměnné predikované modelem po cross-validaci.

Tabulka 13 Plazmatické hladiny ghrelinu, obestatinu a NPY před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové snídaně u pacientek s AN, BN a zdravých žen

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Ghrelín (pg/ml)						
C (n = 11)	1018,9±75,86	844,3±58,15 ⁺	825,7±55,30 ⁺	823,7±74,54 ⁺	803,4±63,06 ⁺	839,4±63,94 ⁺
AN (n = 8)	1761,2±163,37*	1455,7±163,07 ⁺ *	1335,4±136,77 ⁺ *	1368,2±142,03 ⁺ *	1436,8±195,35 ⁺ *	1552,9±212,32*
BN (n = 13)	947,2±16,38	854,3±109,92 ⁺	787,5±101,94 ⁺	769,6±105,94 ⁺	793,5±74,40 ⁺	860,5±75,31
Obestatin (pg/ml)						
C (n = 11)	200,5±15,47	177,0±13,27 ⁺	175,2±13,59 ⁺	167,8±17,02 ⁺	168,4±16,06 ⁺	178,0±14,74 ⁺
AN (n = 8)	393,7±41,99*	343,3±41,64 ⁺ *	330,4±42,56 ⁺ *	327,8±37,52 ⁺ *	354,7±38,91*	370,9±40,43*
BN (n = 13)	276,5±20,03*	243,2±16,80 ⁺ *	240,1±16,15 ⁺ *	230,2±15,85 ⁺ *	238,2±16,14 ⁺ *	249,0±24,15 ⁺ *
Poměr Ghre/Obest						
C (n = 11)	5,09± 0,46	4,77± 0,34	4,72± 0,36	4,71± 0,76	4,84± 0,44	4,72± 0,39
AN (n = 8)	4,49±0,48	4,24±0,67	4,03±0,77	4,16±0,77	4,07±0,62*	4,22±0,67
BN (n = 13)	3,46±0,35*	3,56± 0,41*	3,32±0,32*	3,41±0,37*	3,40±0,28*	3,37±0,29*
NPY (pmol/l)						
C (n = 11)	53,60±0,45	-	46,92±0,48	38,73±0,45 ⁺	-	49,06±0,51 ⁺
AN (n = 8)	64,44±0,63	-	73,26±0,57*	76,70±0,57*	-	79,06±0,63*
BN (n = 13)	77,26±0,42*	-	68,51±0,42*	69,14±0,42*	-	71,16±0,42*

AN – pacientky s anorexia nervosa, BN – pacientky s bulimia nervosa, C – kontrolní skupina zdravých žen. GhreTot – total ghrelin, GhreAcyl – acyl ghrelin, GhreDes – desacyl ghrelin, Ghre/Obest – poměr ghrelin/obestatin, NPY – neuropeptid Y.

Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM.

Index ⁺ označuje signifikantní změnu v postprandiálních hodnotách hormonu při porovnání s bazální hodnotou, pro každou skupinu zvlášť ($p < 0,05$).

Index ^{*} označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami hormonu u skupin AN nebo BN při porovnání se zdravými ženami, v každém čase zvlášť ($p < 0,05$).

Tabulka 14 Antropometrické, biochemické a hormonální parametry patientek s AN, BN a zdravých žen

	AN (n = 14)	BN (n = 15)	Kontroly (n = 14)
Věk (roky)	24,6±1,8	23,2±1,7	24,9±1,4
Tělesná výška (cm)	166,1±2,07	163,7±1,62	168,8±1,01
Tělesná hmotnost (kg)	42,2±1,36* ⁺	54,9±1,55 ⁺	60,1±1,84
BMI (kg/m²)	15,3±0,74* ⁺	20,5±0,93 ⁺	21,1 ± 0,86
FM (%)	12,5±0,63* ⁺	25,8±0,77 ⁺	26,1±0,86
IGF-1 (ng/ml)	235,2±21,99* ⁺	342,5±34,03 ⁺	374,3±47,39
IGFBP-3 (ng/ml)	2988,1±168,25* ⁺	3576,7±132,11 ⁺	3323,6±147,64
Ghrelin (pg/ml)	1715,8±161,48* ⁺	981,8±61,66 ⁺	1003,9 ± 67,72
Obestatin (pg/ml)	392,4±26,58* ⁺	293,7±33,82* ⁺	205,9±18,24
NPY (pmol/l)	66,0±5,69* ⁺	80,8±6,90* ⁺	53,1±7,09
PYY (pg/ml)	143,7±9,71	139,6±14,83	129,7±9,96
Leptin (ng/ml)	1,8±0,24* ⁺	5,7±1,0* ⁺	9,6±1,19

AN – pacientky s anorexia nervosa, BN – pacientky s bulimia nervosa, kontroly – kontrolní soubor zdravých žen, FM – fat mass, tuková hmota.

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.

Index * označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN nebo BN a kontrol (p < 0,05).

Index ⁺ označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN a BN (p < 0,05).

Tabulka 15 Spearmanovy korelace mezi antropometrickými, biochemickými a hormonálními parametry u pacientek s AN

		TH	BMI	FM (%)	IGF-1	Ghrelin	Obestatin	Ghre_Ob	NPY	PYY	Leptin
TH	<i>r</i>	1,000	0,608	0,534	0,554	0,260	0,324	0,041	-0,115	0,065	0,309
	<i>p</i>	0,000	0,010	0,027	0,021	0,314	0,222	0,880	0,672	0,812	0,228
BMI	<i>r</i>	0,608	1,000	0,602	0,708	0,157	0,303	-0,118	-0,026	0,247	0,679
	<i>p</i>	0,010	0,000	0,010	0,001	0,548	0,254	0,664	0,922	0,356	0,003
FM (%)	<i>r</i>	0,534	0,602	1,000	0,404	0,509	0,374	0,081	-0,010	-0,027	0,248
	<i>p</i>	0,027	0,010	0,000	0,108	0,037	0,154	0,766	0,970	0,922	0,337
IGF-1	<i>r</i>	0,554	0,708	0,404	1,000	0,127	0,000	0,071	0,350	0,371	0,419
	<i>p</i>	0,021	0,001	0,108	0,000	0,626	1,000	0,795	0,184	0,158	0,094
Ghrelin	<i>r</i>	0,260	0,157	0,509	0,127	1,000	0,018	0,697	-0,147	-0,168	0,248
	<i>p</i>	0,314	0,548	0,037	0,626	0,000	0,948	0,003	0,587	0,535	0,338
Obestatin	<i>r</i>	0,324	0,303	0,374	0,000	0,018	1,000	-0,650	-0,350	-0,032	0,303
	<i>p</i>	0,222	0,254	0,154	1,000	0,948	0,000	0,006	0,201	0,909	0,254
Ghre_Ob	<i>r</i>	0,041	-0,118	0,081	0,071	0,697	-0,650	1,000	0,314	-0,093	-0,044
	<i>p</i>	0,880	0,664	0,766	0,795	0,003	0,006	0,000	0,254	0,742	0,871
NPY	<i>r</i>	-0,115	-0,026	-0,010	0,350	-0,147	-0,350	0,314	1,000	0,336	-0,188
	<i>p</i>	0,672	0,922	0,970	0,184	0,587	0,201	0,254	0,000	0,221	0,485
PYY	<i>r</i>	0,065	0,247	-0,027	0,371	-0,168	-0,032	-0,093	0,336	1,000	0,179
	<i>p</i>	0,812	0,356	0,922	0,158	0,535	0,909	0,742	0,221	0,000	0,506
Leptin	<i>r</i>	0,309	0,679	0,248	0,419	0,248	0,303	-0,044	-0,188	0,179	1,000
	<i>p</i>	0,228	0,003	0,337	0,094	0,338	0,254	0,871	0,485	0,506	0,000

r – korelační koeficient, *p* – *p*-value, TH – tělesná hmotnost, BMI – body mass index, FM – fat mass, tuková hmota, Ghre_Ob – poměr ghrelin/obestatin

Tabulka 16 Spearmanovy korelace mezi antropometrickými, biochemickými a hormonálními parametry u pacientek s BN

		TH	BMI	FM (%)	IGF-1	Ghrelin	Obestatin	Ghre_Ob	NPY	PYY	Leptin
TH	<i>r</i>	1,000	0,718	0,605	0,176	-0,493	-0,170	-0,060	-0,274	0,011	0,554
	<i>p</i>	0,000	0,001	0,010	0,498	0,045	0,578	0,845	0,305	0,970	0,021
BMI	<i>r</i>	0,718	1,000	0,674	-0,140	-0,368	0,104	-0,192	-0,347	-0,075	0,493
	<i>p</i>	0,001	0,000	0,003	0,593	0,147	0,734	0,529	0,188	0,791	0,045
FM (%)	<i>r</i>	0,605	0,674	1,000	-0,244	-0,408	0,228	-0,327	-0,038	-0,225	0,614
	<i>p</i>	0,010	0,003	0,000	0,345	0,104	0,453	0,275	0,888	0,420	0,009
IGF-1	<i>r</i>	0,176	-0,140	-0,244	1,000	0,402	-0,104	0,126	-0,162	0,257	-0,355
	<i>p</i>	0,498	0,593	0,345	0,000	0,110	0,734	0,681	0,549	0,355	0,162
Ghrelin	<i>r</i>	-0,493	-0,368	-0,408	0,402	1,000	0,181	0,110	0,044	0,050	-0,397
	<i>p</i>	0,045	0,147	0,104	0,110	0,000	0,553	0,721	0,871	0,860	0,115
Obestatin	<i>r</i>	-0,170	0,104	0,228	-0,104	0,181	1,000	-0,863	-0,390	0,044	-0,187
	<i>p</i>	0,578	0,734	0,453	0,734	0,553	0,000	0,000	0,188	0,887	0,541
Ghre_Ob	<i>r</i>	-0,060	-0,192	-0,327	0,126	0,110	-0,863	1,000	0,352	-0,231	-0,121
	<i>p</i>	0,845	0,529	0,275	0,681	0,721	0,000	0,000	0,239	0,448	0,694
NPY	<i>r</i>	-0,274	-0,347	-0,038	-0,162	0,044	-0,390	0,352	1,000	-0,071	0,218
	<i>p</i>	0,305	0,188	0,888	0,549	0,871	0,188	0,239	0,000	0,800	0,418
PYY	<i>r</i>	0,011	-0,075	-0,225	0,257	0,050	0,044	-0,231	-0,071	1,000	-0,071
	<i>p</i>	0,970	0,791	0,420	0,355	0,860	0,887	0,448	0,800	0,000	0,800
Leptin	<i>r</i>	0,554	0,493	0,614	-0,355	-0,397	-0,187	-0,121	0,218	-0,071	1,000
	<i>p</i>	0,021	0,045	0,009	0,162	0,115	0,541	0,694	0,418	0,800	0,000

r – korelační koeficient, *p* – *p*-value, TH – tělesná hmotnost, BMI – body mass index, FM – fat mass, tuková hmota, Ghre_Ob – poměr ghrelin/obestatin

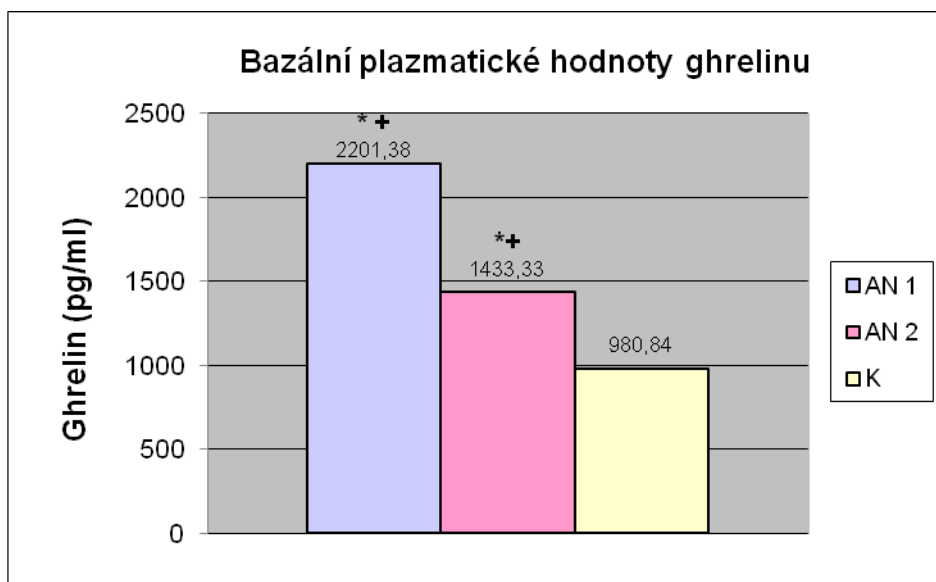
Tabulka 17 Spearmanovy korelace mezi antropometrickými, biochemickými a hormonálními parametry u zdravých žen

		TH	BMI	FM (%)	IGF-1	Ghrelin	Obestatin	Ghre_Ob	NPY	PYY	Leptin
TH	<i>r</i>	1,000	0,820	0,589	-0,207	-0,200	0,213	0,085	-0,119	0,243	0,060
	<i>p</i>	0,000	0,001	0,044	0,519	0,534	0,555	0,815	0,712	0,529	0,854
BMI	<i>r</i>	0,820	1,000	0,729	-0,119	-0,175	0,430	-0,285	0,035	0,233	0,021
	<i>p</i>	0,001	0,000	0,007	0,713	0,587	0,214	0,425	0,914	0,546	0,948
FM (%)	<i>r</i>	0,589	0,729	1,000	-0,133	-0,354	0,103	-0,055	-0,074	-0,100	-0,137
	<i>p</i>	0,044	0,007	0,000	0,680	0,259	0,776	0,881	0,820	0,798	0,672
IGF-1	<i>r</i>	-0,207	-0,119	-0,133	1,000	-0,469	-0,576	0,236	-0,042	-0,067	-0,175
	<i>p</i>	0,519	0,713	0,680	0,000	0,124	0,082	0,511	0,897	0,865	0,587
Ghrelin	<i>r</i>	-0,200	-0,175	-0,354	-0,469	1,000	0,418	0,067	0,476	0,583	0,063
	<i>p</i>	0,534	0,587	0,259	0,124	0,000	0,229	0,855	0,118	0,099	0,846
Obestatin	<i>r</i>	0,213	0,430	0,103	-0,576	0,418	1,000	-0,794	0,648	0,190	0,309
	<i>p</i>	0,555	0,214	0,776	0,082	0,229	0,000	0,006	0,043	0,651	0,385
Ghre_Ob	<i>r</i>	0,085	-0,285	-0,055	0,236	0,067	-0,794	1,000	-0,564	0,143	-0,406
	<i>p</i>	0,815	0,425	0,881	0,511	0,855	0,006	0,000	0,090	0,736	0,244
NPY	<i>r</i>	-0,119	0,035	-0,074	-0,042	0,476	0,648	-0,564	1,000	0,433	0,077
	<i>p</i>	0,712	0,914	0,820	0,897	0,118	0,043	0,090	0,000	0,244	0,812
PYY	<i>r</i>	0,243	0,233	-0,100	-0,067	0,583	0,190	0,143	0,433	1,000	0,133
	<i>p</i>	0,529	0,546	0,798	0,865	0,099	0,651	0,736	0,244	0,000	0,732
Leptin	<i>r</i>	0,060	0,021	-0,137	-0,175	0,063	0,309	-0,406	0,077	0,133	1,000
	<i>p</i>	0,854	0,948	0,672	0,587	0,846	0,385	0,244	0,812	0,732	0,000

r – korelační koeficient, *p* – *p*-value, TH – tělesná hmotnost, BMI – body mass index, FM – fat mass, tuková hmota, Ghre_Ob – poměr ghrelin/obestatin

Přílohy: Grafy

Graf 1. Plazmatické hladiny ghrelinu u pacientek s AN před a po šestitýdenní léčbě a porovnání se skupinou zdravých žen.

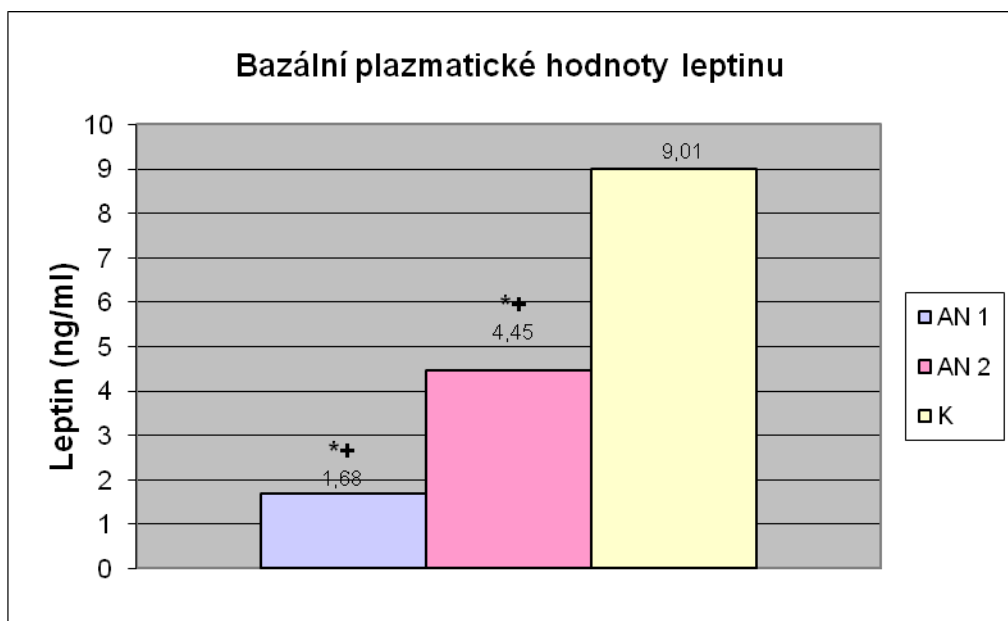


AN 1 – pacientky s anorexia nervosa před léčbou, AN 2 – pacientky s anorexia nervosa po šestitýdenní léčbě, K – kontrolní skupina zdravých žen.

Index * označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN před léčbou a po léčbě ($p < 0,05$).

Index + označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN 1 nebo AN 2 a zdravých žen ($p < 0,05$).

Graf 2. Plazmatické hladiny leptinu u pacientek s AN před a po šestitýdenní léčbě a porovnání se skupinou zdravých žen.

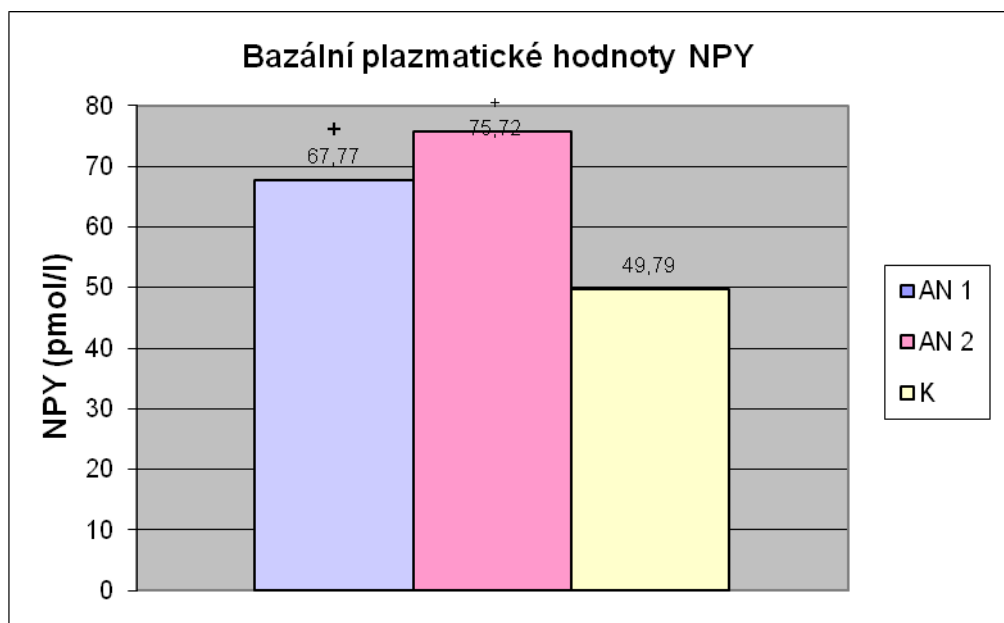


AN 1 – pacientky s anorexia nervosa před léčbou, AN 2 – pacientky s anorexia nervosa po šestitýdenní léčbě, K – kontrolní skupina zdravých žen.

Index * označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN před léčbou a po léčbě ($p < 0,05$).

Index + označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN 1 nebo AN 2 a zdravých žen ($p < 0,05$).

Graf 3. Plazmatické hladiny NPY u pacientek s AN před a po šestitýdenní léčbě a porovnání se skupinou zdravých žen.

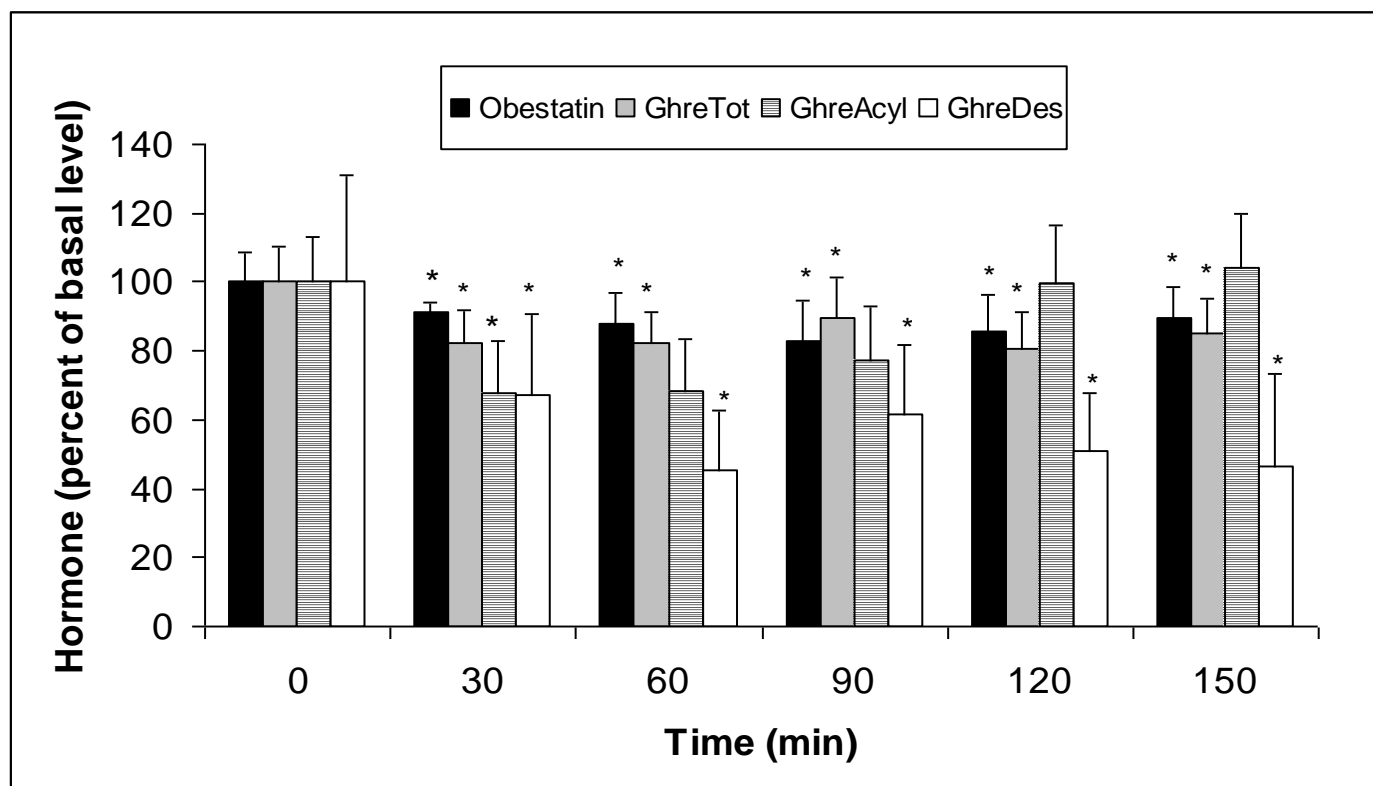


AN 1 – pacientky s anorexia nervosa před léčbou, AN 2 – pacientky s anorexia nervosa po šestitýdenní léčbě, K – kontrolní skupina zdravých žen.

Index * označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN před léčbou a po léčbě ($p < 0,05$).

Index + označuje signifikantní rozdíl mezi hodnotami AN 1 nebo AN 2 a zdravých žen ($p < 0,05$).

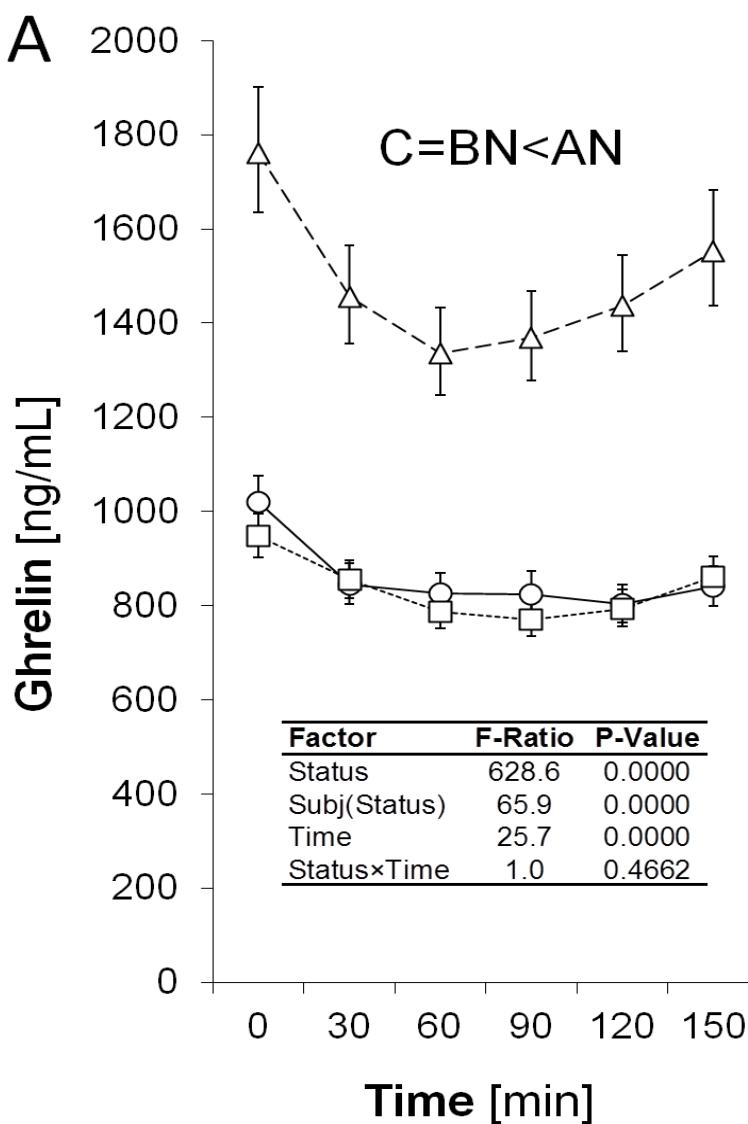
Graf 4. Plazmatické hladiny obestatinu, total ghrelinu, acyl a desacyl ghrelinu před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové snídani u pacientek s AN, BN a zdravých žen.



GhreTot – total ghrelin, GhreAcyl – acyl ghrelin, GhreDes – desacyl ghrelin. Data jsou vyjádřena v procentech.

Index * označuje signifikantní změnu v hladině hormonu při porovnání s bazální hodnotou ($p < 0,05$).

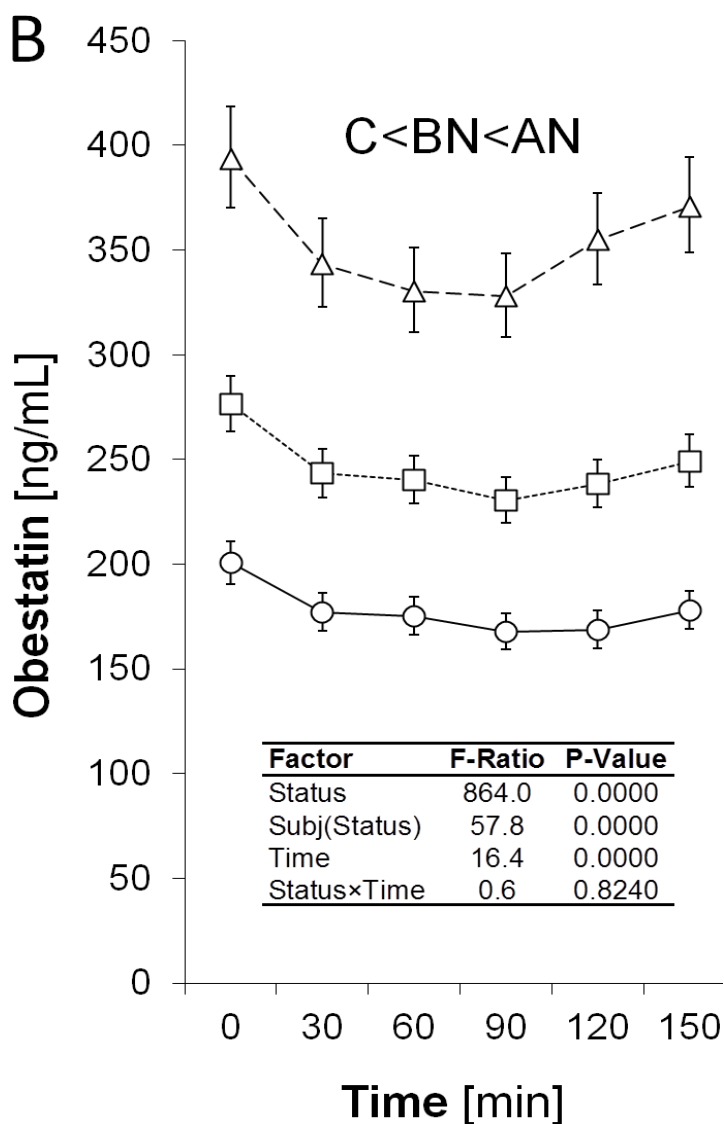
Graf 5. Plazmatické hladiny ghreluinu před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové snídane u pacientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = pacientky s AN, symbol \square = pacientky s BN, symbol \bigcirc = zdravé ženy (C)

Symbol „<“ znamená „signifikantně nižší než“ ($p < 0,05$).

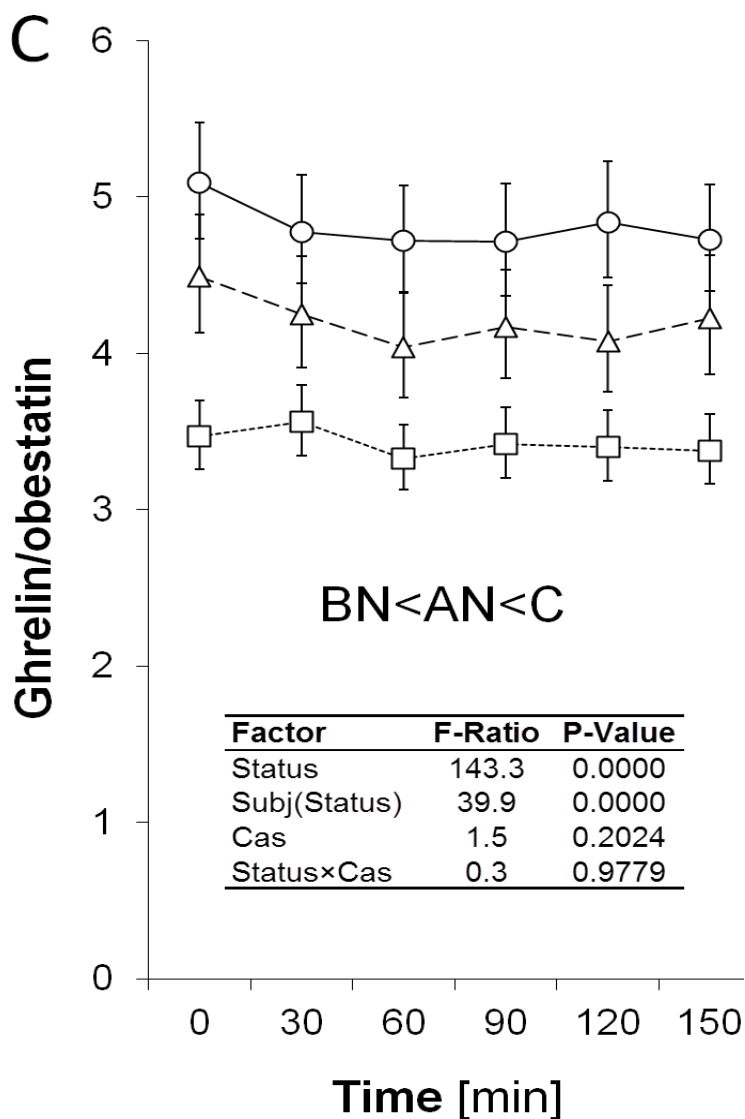
Graf 6. Plazmatické hladiny obestatinu před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové snídane u patientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = patientky s AN, symbol \square = patientky s BN, symbol \bigcirc = zdravé ženy (C)

Symbol „<“ znamená „signifikantně nižší než“ ($p < 0,05$).

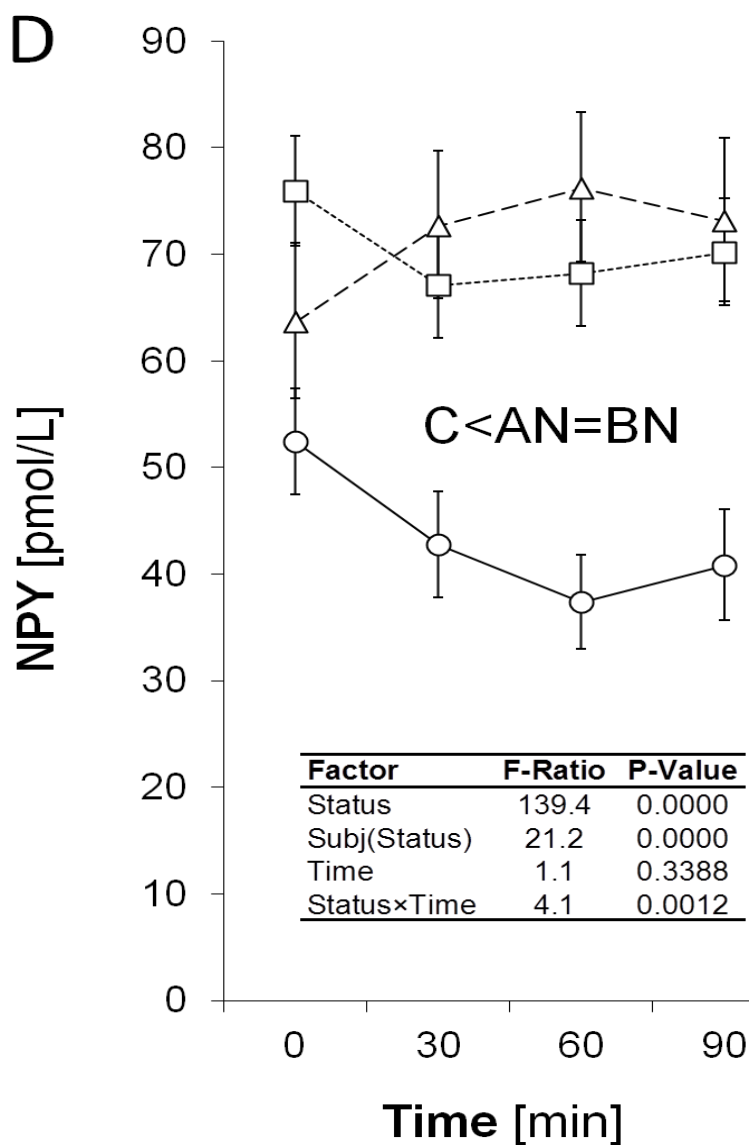
Graf 7. Poměr ghrelin/obestatin před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové snídane u patientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = patientky s AN, symbol \square = patientky s BN, symbol \bigcirc = zdravé ženy (C)

Symbol „<“ znamená „signifikantně nižší než“ ($p < 0,05$).

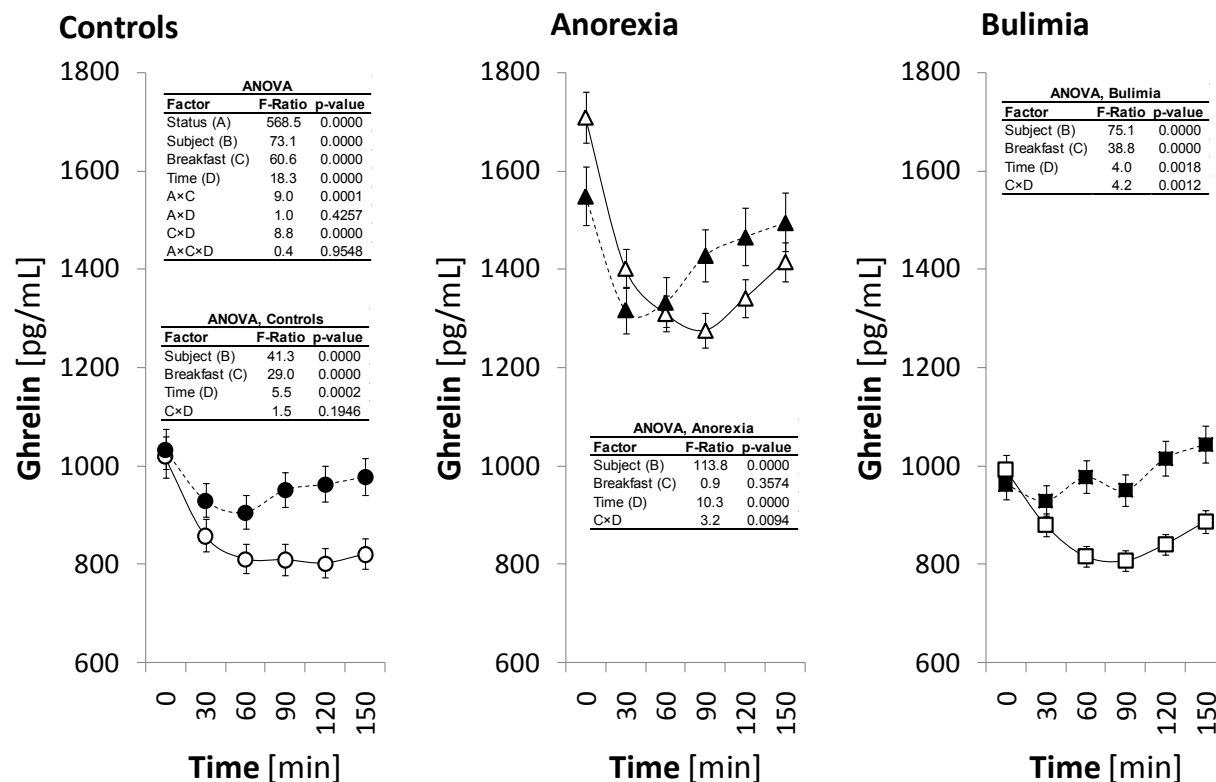
Graf 8. Plazmatické hladiny NPY před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové snídani u pacientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = pacientky s AN, symbol \square = pacientky s BN, symbol \bigcirc = zdravé ženy (C)

Symbol „<“ znamená „signifikantně nižší než“ ($p < 0,05$).

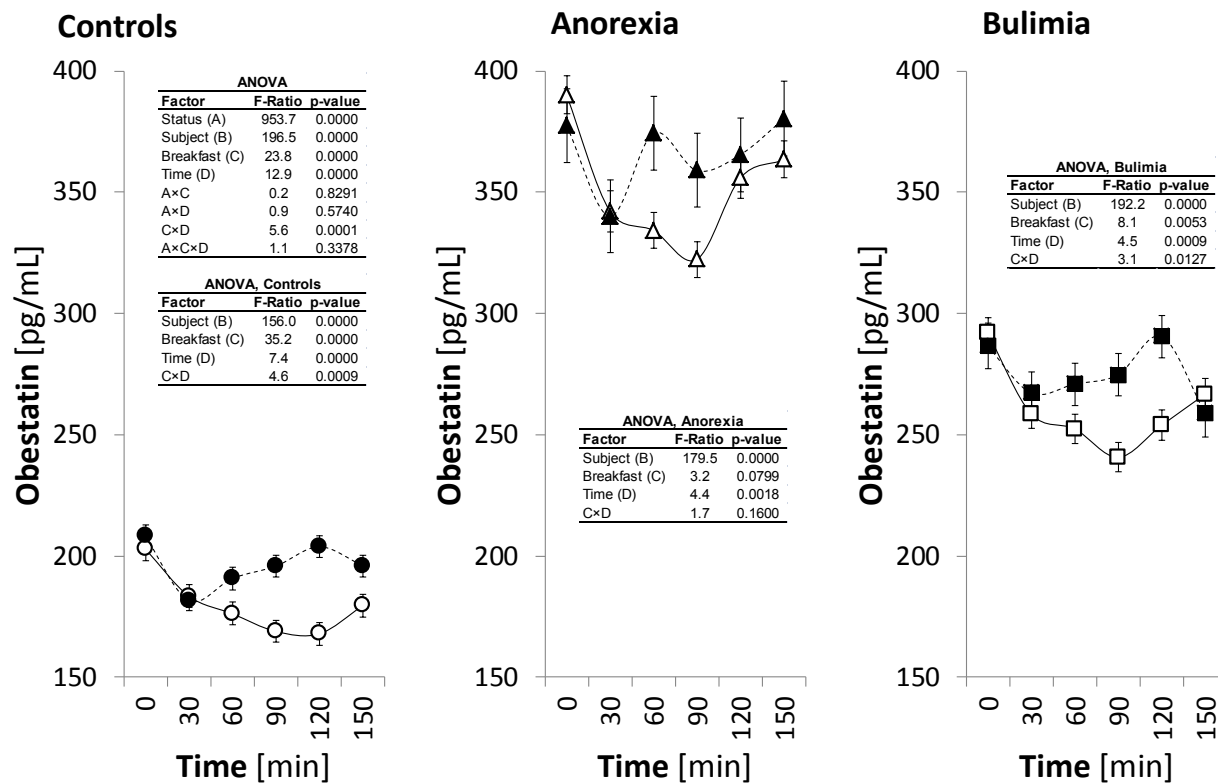
Graf 9. Plazmatické hladiny ghrelinu před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové a proteinové snídaně u pacientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = pacientky s AN, symbol \square = pacientky s BN, symbol \circ = zdravé ženy (C).

Sacharidová snídaně je označena prázdným symbolem (Δ, \square, \circ), proteinová snídaně plným symbolem ($\blacktriangle, \blacksquare, \bullet$).

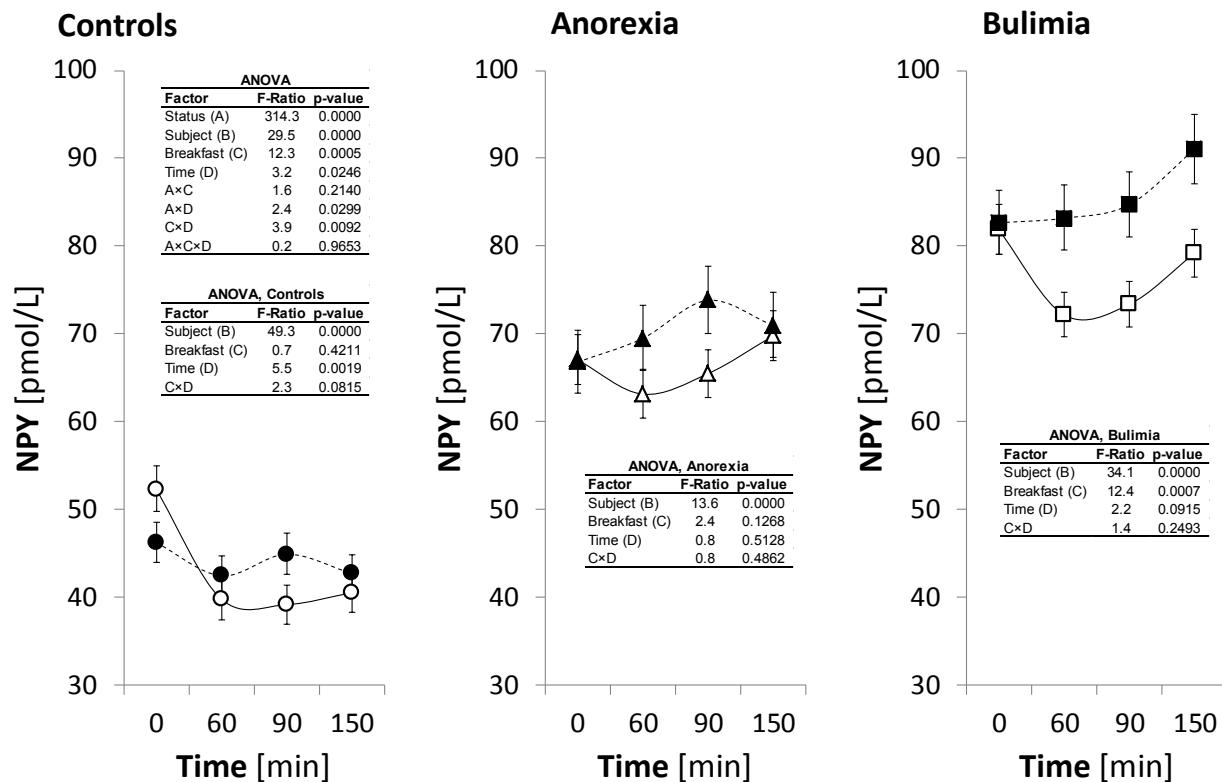
Graf 10. Plazmatické hladiny obestatinu před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové a proteinové snídaně u pacientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = pacientky s AN, symbol \square = pacientky s BN, symbol \circ = zdravé ženy (C).

Sacharidová snídaně je označena prázdným symbolem (Δ, \square, \circ), proteinová snídaně plným symbolem ($\blacktriangle, \blacksquare, \bullet$).

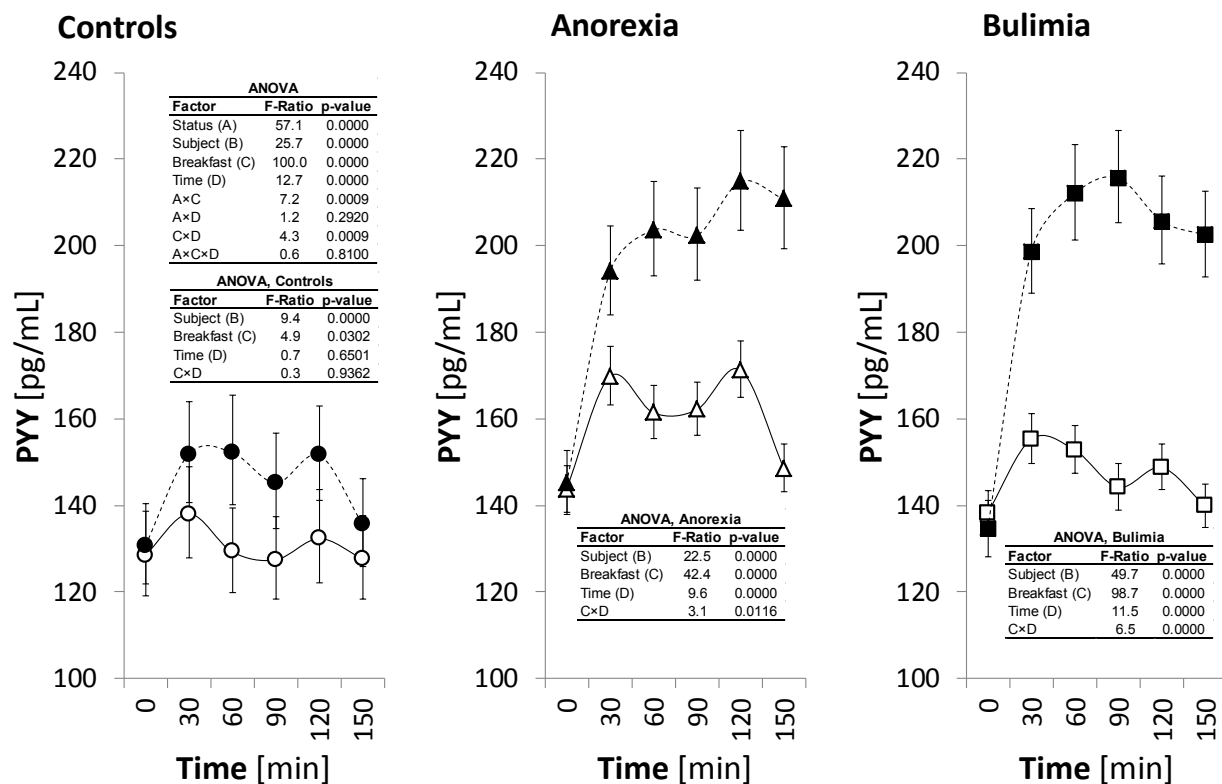
Graf 11. Plazmatické hladiny NPY před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové a proteinové snídane u pacientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = pacientky s AN, symbol \square = pacientky s BN, symbol \circ = zdravé ženy (C).

Sacharidová snídane je označena prázdným symbolem (Δ, \square, \circ), proteinová snídane plným symbolem ($\blacktriangle, \blacksquare, \bullet$).

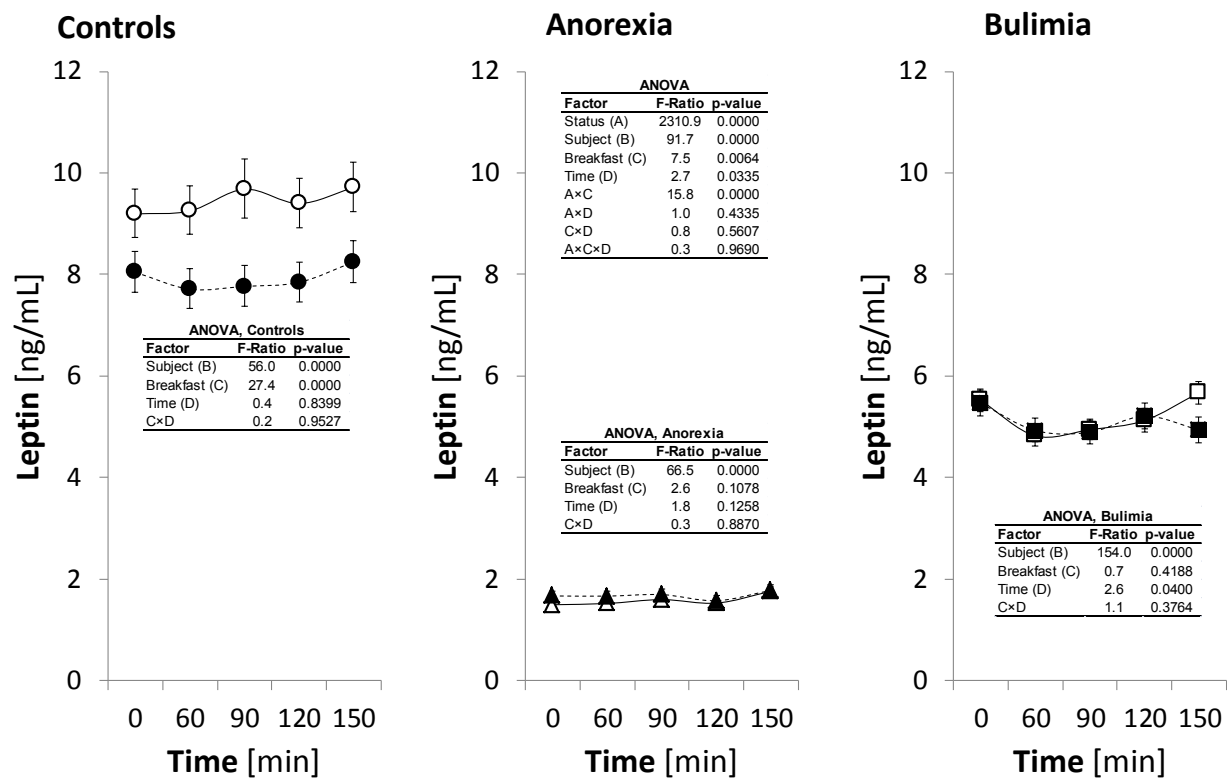
Graf 12. Plazmatické hladiny PYY před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové a proteinové snídaně u pacientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = pacientky s AN, symbol \square = pacientky s BN, symbol \circ = zdravé ženy (C).

Sacharidová snídaně je označena prázdným symbolem (Δ, \square, \circ), proteinová snídaně plným symbolem ($\blacktriangle, \blacksquare, \bullet$).

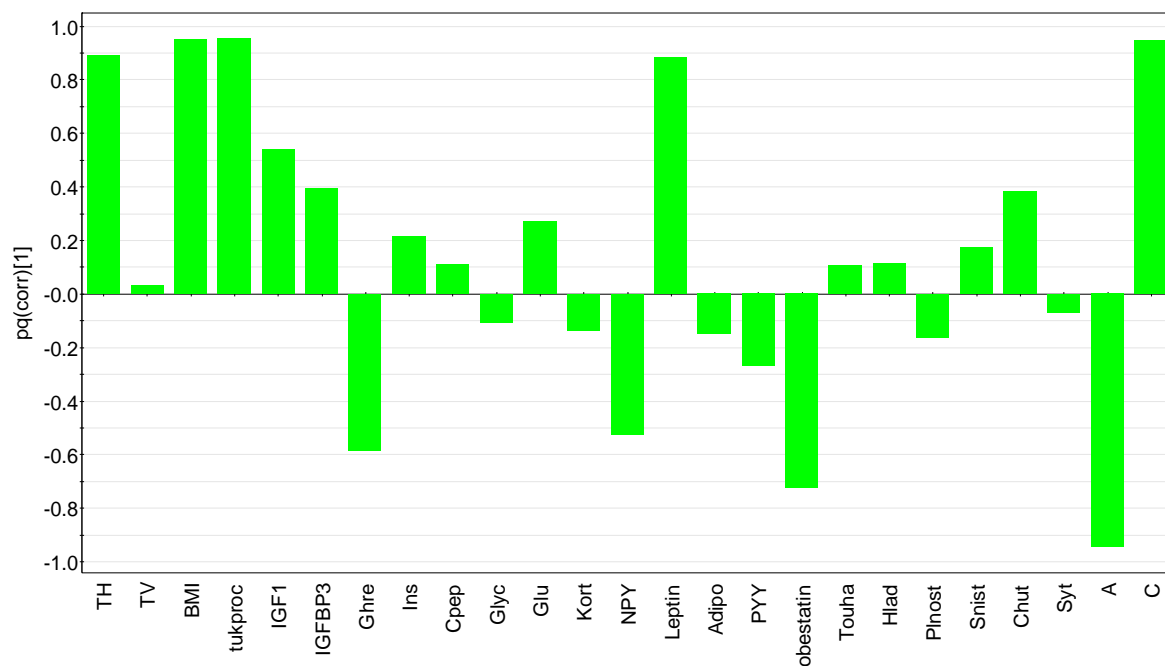
Graf 13. Plazmatické hladiny leptinu před (0 min) a po konzumaci (30, 60, 90, 120, 150 min) sacharidové a proteinové snídaně u pacientek s AN, BN a zdravých žen.



Symbol Δ = pacientky s AN, symbol \square = pacientky s BN, symbol \circ = zdravé ženy (C).

Sacharidová snídaně je označena prázdným symbolem (Δ, \square, \circ), proteinová snídaně plným symbolem ($\blacktriangle, \blacksquare, \bullet$).

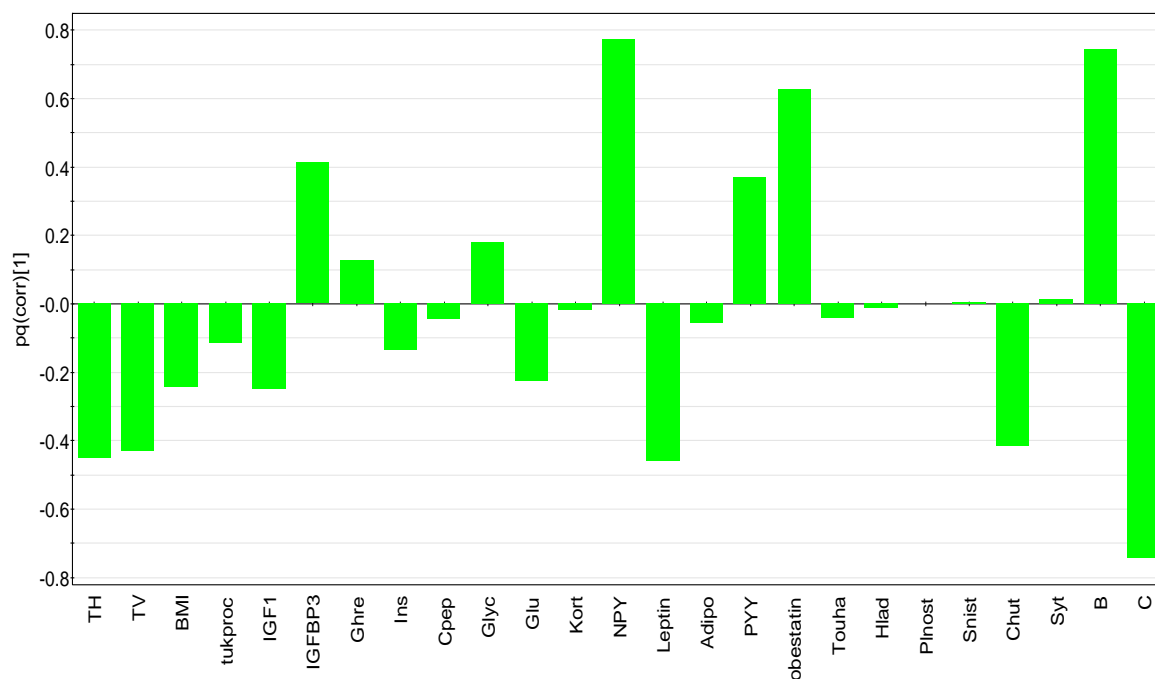
Graf 14. Vztahy mezi statusem anorexia nervosa a antropometrickými, biochemickými a hormonálními parametry u skupiny pacientek s AN.



Vyjádřeno ve formě korelačních koeficientů jednotlivých proměnných se společnou prediktivní komponentou.

pq(corr)[1] – prediktivní komponenta, A – pacientky s AN, C – zdravé ženy, TH – tělesná hmotnost, TV – tělesná výška, BMI – body mass index, tukproc – procento tělesného tuku, ghre – ghrelin

Graf 15. Vztahy mezi statusem bulimia nervosa a antropometrickými, biochemickými a hormonálními parametry u skupiny pacientek s BN.



Vyjádřeno ve formě korelačních koeficientů jednotlivých proměnných se společnou prediktivní komponentou.

pq(corr)[1] – prediktivní komponenta, A – pacientky s AN, C – zdravé ženy, TH – tělesná hmotnost, TV – tělesná výška, BMI – body mass index, tukproc – procento tělesného tuku, ghre – ghrelin

Publikační činnost

V této části je uveden seznam publikační činnosti po dobu doktorského studia (2004–2012).

Publikace v impaktovaných časopisech

Sedlackova D, Dostalova I, Hainer V, Beranova L, Kvasnickova H, Hill M, Haluzik M, Nedvidkova J (2008). Simultaneous decrease of plasma obestatin and ghrelin levels after a high-carbohydrate breakfast in healthy women. *Physiological Research* 57 Suppl 1:S29–37. IF = 1,653

Zamrazilova H, Hainer V, Sedlackova D, Papezova H, Kunesova M, Bellisle F, Hill M, Nedvidkova J (2008). Plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women. *Physiological Research* 57 Suppl 1:S49–55. IF = 1,653

Dostalova I, Sedlackova D, Papezova H, Nedvidkova J, Haluzik M (2009). Serum visfatin levels in patients with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Physiological Research* 58(6):903–7. IF = 1,43

Sedlackova D, Kopeckova J, Papezova H, Vybiral S, Kvasnickova H, Hill M, Nedvidkova J (2011). Changes of plasma obestatin, ghrelin and NPY in anorexia and bulimia nervosa patients before and after a high-carbohydrate breakfast. *Physiological Research* 60(1):165–73. IF = 1,646

Sedlackova D, Kopeckova J, Papezova H, Hainer V, Kvasnickova H, Hill M, Nedvidkova J (2012). Comparison of a high-carbohydrate and high-protein breakfast effect on plasma ghrelin, obestatin, NPY and PYY levels in women with anorexia and bulimia nervosa. *Nutrition and Metabolism* (přijato k tisku 05/2012). IF = 2,35

Publikace v neimpaktovaných časopisech

Beranová L, Sedláčková D, Kopečková J, Hainer V, Papežová H, Kvasničková H, Nedvídková J (2009). Plazmatické hladiny neuropeptidu Y, ghrelinu a leptinu u pacientek

s anorexia nervosa a jejich změny po šestitýdenní realimentaci. Vnitřní lékařství 55(10):925–8.

Doubková H, Kopečková J, Sedláčková D, Haluzík M, Kvasničková H, Papežová H, Hainer V, Nedvídková J (2010). Změny plazmatických hladin obestatinu a ghrelinu po podání rozpustné vlákniny s glukózou a samotné vlákniny zdravým ženám a pacientkám s bulimia nervosa. Časopis lékařů českých 149(11):542–5.

Publikace jsou přiložené v uvedeném pořadí.

Přílohy: Publikace

Simultaneous Decrease of Plasma Obestatin and Ghrelin Levels after a High-Carbohydrate Breakfast in Healthy Women

D. SEDLÁČKOVÁ¹, I. DOSTÁLOVÁ¹, V. HAINER¹, L. BERANOVÁ¹,
H. KVASNIČKOVÁ¹, M. HILL¹, M. HALUZÍK², J. NEDVÍDKOVÁ¹

¹Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, ²Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received November 12, 2007

Accepted January 17, 2008

On-line February 13, 2008

Summary

Ghrelin is a gut peptide produced mainly by stomach, well known to induce appetite stimulatory actions. Obestatin, a recently identified peptide derived from preproghrelin, was initially described to antagonize stimulatory effect of ghrelin on food intake. The postprandial response of obestatin and its relationship with ghrelin in humans remains unknown. We therefore investigated the postprandial response of obestatin and total ghrelin, acyl and desacyl ghrelin and neuropeptide Y (NPY) to a high-carbohydrate breakfast (1 604 kJ) in eight healthy women (age: 24.2±0.82 years; BMI 21.6±0.61 kg/m²). Blood samples were collected before the meal, and 30, 60, 90, 120 and 150 min after the breakfast consumption. Postprandial plasma obestatin concentrations significantly decreased compared with preprandial levels as well as total ghrelin concentrations and reached the lowest values 90 and 120 min after the meal consumption, respectively ($p<0.05$). Plasma acyl and desacyl ghrelin concentrations decreased after the breakfast and reached lowest values in 30 and 60 min, respectively ($p<0.05$). Plasma NPY concentrations were lower than preprandial levels 90 and 150 min after consuming breakfast ($p<0.05$). In conclusion, we demonstrated in healthy young women that plasma obestatin concentrations decrease similarly to ghrelin after a high-carbohydrate breakfast.

Key words

Obestatin • Total ghrelin • Acyl ghrelin • Desacyl ghrelin • Carbohydrate breakfast

Corresponding author

Jara Nedvídková, Institute of Endocrinology, Národní třída 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. Email: jnedvidkova@endo.cz

Introduction

Ghrelin is a 28-amino acid peptide predominantly produced by the stomach, although its expression has also been confirmed in many other tissues (Kojima *et al.* 1999, Muccioli *et al.* 2002, Broglio *et al.* 2003, Bilgin *et al.* 2007). Ghrelin has been discovered as a natural ligand of the orphan growth hormone secretagogue (GHS) receptor (GHS-R) type 1a (GHS-R1a), which is widely distributed in both central and peripheral tissues (Kojima *et al.* 2001, Muccioli *et al.* 2002, Gnanapavan *et al.* 2002). Ghrelin secretion is mainly under metabolic control as it is increased by fasting and energy restriction but decreased by food intake, glucose and insulin (Lucidi *et al.* 2002, Shiya *et al.* 2002, Ukkola 2003, Broglio *et al.* 2003, Nedvídková *et al.* 2003, Flanagan *et al.* 2003, Dostálová *et al.* 2007). In agreement with the major influence of nutrition, ghrelin levels are increased in anorexia and cachexia but reduced in obesity (Muccioli *et al.* 2002, Ukkola 2003, Rosická *et al.* 2003, Broglio *et al.* 2003, Dostálová and Haluzík 2007). Ghrelin is the first natural hormone known to date in which the hydroxyl group of one of its serine residues is acylated by n-octanoic acid (Kojima *et al.* 1999). This acylation is essential for binding to the GHS-R1a receptor, for the GH-releasing capacity of ghrelin and likely also for its other endocrine and physiological actions (Kojima *et al.* 1999, Matsumoto *et al.* 2001, Muccioli *et al.* 2001). However, unacylated ghrelin is not biologically inactive, as acylated ghrelin it exhibits some cardiovascular actions and the ability to modulate cell proliferation (Cassoni *et al.* 2001, Baldanzi

et al. 2002, Bedendi *et al.* 2003) and plays a role in the regulation of food intake (Asakawa *et al.* 2005). In this context, it is not by chance that unacylated ghrelin circulates at 2.5-fold higher concentration than the acylated form (Kojima *et al.* 2001, Muccioli *et al.* 2002).

Ghrelin-associated peptide obestatin is a recently discovered 23-amino acid peptide hormone derived from the same gene as ghrelin, first described by Zhang *et al.* (2005) to activate the orphan G protein-coupled receptor GPR39. However, several other groups failed to obtain reproducible obestatin binding and signaling in GPR39 receptor transfected cells (Jackson *et al.* 2006, Holst *et al.* 2007, Tremblay *et al.* 2007) even using the same conditions as previously reported by Zhang *et al.* (2005). Since the discovery of obestatin and its suppressive effect on food intake in fasted/refed mice (Zhang *et al.* 2005), the vast majority of subsequent studies (Gourcerol *et al.* 2006, Samson *et al.* 2007, Holst *et al.* 2007, Nogueiras *et al.* 2007, Yamamoto *et al.* 2007, Zizzari *et al.* 2007), except two (Tremblay *et al.* 2007, Carlini *et al.* 2007), could not reproduce the initially reported anorexigenic property of obestatin. In addition to the recent controversy over the effects of obestatin, further studies researching peripheral or central injection of obestatin in mice found that it does not affect food intake (Gourcerol *et al.* 2006, De Smet *et al.* 2007, Bassil *et al.* 2007, Nogueiras *et al.* 2007). The role of human obestatin and the kind of immunoreactivity measured in human has still been highly disputable (Bang *et al.* 2007, Chartrel *et al.* 2007) and the interaction between obestatin and ghrelin in the regulation of food intake has also been under question (Seoane *et al.* 2006, Nogueiras *et al.* 2007). However, the circulating preprandial ghrelin to obestatin-like immunoreactivity ratio may be of importance in the etiology and pathophysiology of obesity (Guo *et al.* 2007).

The identification of obestatin as novel peptide hormone derived from the same gene as ghrelin has recently added further complexity to the ghrelin physiology. Despite rapid progress in this field of interest, many questions still remain to be answered, including the regulation of ghrelin and obestatin secretion and their precise physiological endocrine roles. To our best knowledge, no data have been published yet regarding the effect of high-carbohydrate breakfast consumption on postprandial plasma obestatin and total, acyl and desacyl ghrelin response in healthy weight women. Thus, the aim of our study was to characterize plasma obestatin and ghrelin responses to a high-

carbohydrate breakfast in healthy women and to investigate the physiological relationship of these hormones with insulin and neuropeptide Y (NPY).

Methods

Subjects

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethic Review Committee of the Institute of Endocrinology in Prague. Prior to the study, all participants provided written informed consent concerning participation in the study.

Eight healthy Czech women (age: 24.2 ± 0.82 years; body mass index (BMI) 21.6 ± 0.61 kg/m²) were enrolled in this study. The women had no history of eating disorders, had normal electrocardiogram (ECG), blood count, liver and renal function. All women had regular menstrual cycles and were in the follicular phase of their cycle at the time of the study. Women were recommended to avoid vigorous physical activity for 24 hours prior to the experiment, consumed a standardized dinner at 6 pm the day before the experiment and were asked not to eat and drink during the night. All participants were admitted to the Institute of Endocrinology at 7.30 am. Firstly, all of them underwent physical and ECG examination, and body weight and height measurements. The study took place in a room kept at 23–25 °C and the women were lying in bed during study. Overall, the study lasted about 3.5 hours and the protocol consisted of high-carbohydrate breakfast consumption and blood withdrawals.

Study design

Each subject received a high-carbohydrate breakfast with a total energy content of 1604 kJ, consisting of 81.9 g carbohydrates, 8.8 g protein and 3.4 g fat in the form of a white bread roll (90 g) and strawberry jam (50 g). In addition, the subjects consumed 250 ml of fruit tea without sugar or other sweetener with the meal. Participants were given 15 minutes to consume their meal.

Blood samples were drawn from the cubital vein using an intravenous cannula, the first blood drawn was collected before meal, and then 30, 60, 90, 120 and 150 min after breakfast consumption. Blood samples were collected into chilled polypropylene tubes containing Na₂EDTA and antilysin. Plasma was immediately separated by 15-min centrifugation at 5 °C and stored at

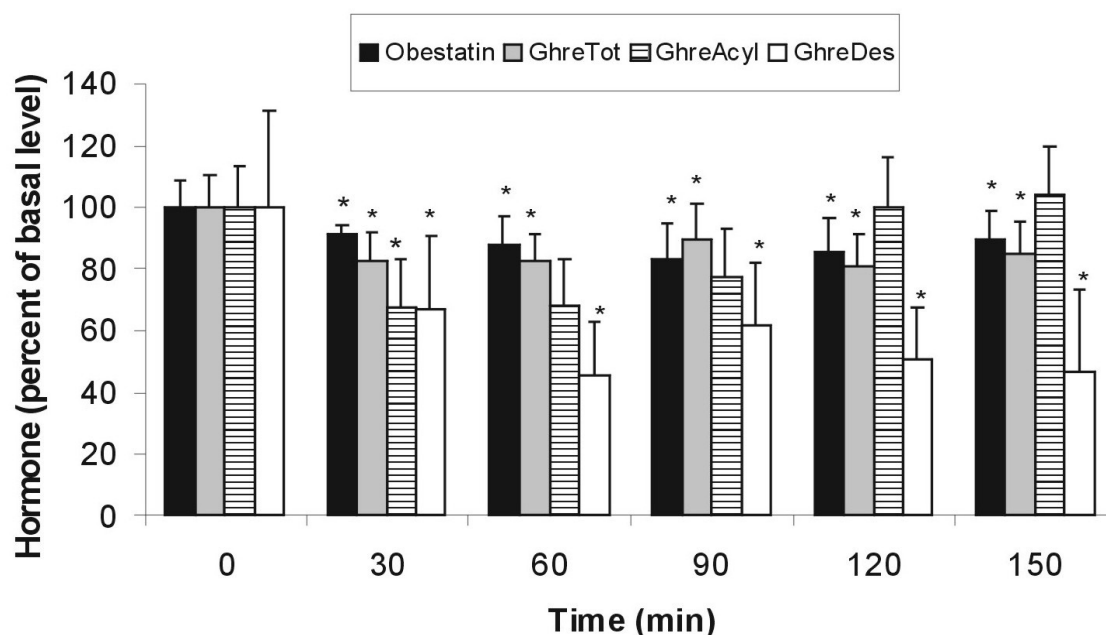


Fig. 1. The percent of postprandial decrease in plasma levels of obestatin, total ghrelin, acyl and desacyl ghrelin. GhreTot - Ghrelin total, GhreAcyl - Ghrelin Acyl, GhreDes - Ghrelin desacyl. *change in hormone level compared with preprandial status (time 0'), $p < 0.05$

–70 °C until being assayed. Plasma for acyl and desacyl ghrelin assay was acidified by 1N HCl in ratio 1/10 after centrifugation.

Analytical measurements

Plasma obestatin immunoreactivity was measured with a commercial RIA kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, U.S.A.), the intra- and interassay variability was 5.0 % and 14.2 %, respectively, sensitivity was 50 pg/ml. Total plasma ghrelin, leptin and NPY were determined using commercially available RIA kits (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, U.S.A.). The intra- and interassay of total ghrelin was 6.4 % and 16.3 %, sensitivity 93 pg/ml; intra- and interassay of leptin was 4.9 % and 4.5 %, sensitivity 0.5 ng/ml; intra- and interassay of NPY was 3.3 % and 11.6 %, sensitivity 6 pmol/l. Acyl and desacyl plasma ghrelin were determined by ELISA kit (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, U.S.A.). The intra- and interassay of acyl ghrelin was 4.3 % and 3.5 %, sensitivity 2.5 fmol/ml; the intra and interassay of desacyl ghrelin was 3.5 % and 6.7 %, sensitivity 12.5 fmol/ml. Plasma insulin levels were determined by commercial RIA kit (Immunotech, Inc., Prague, Czech Republic), the intra- and interassay of insulin was 3.3 % and 2.9 %, sensitivity 0.5 μ IU/ml.

Statistical analysis

All results are expressed as means \pm SEM. The

time courses of dependent variables were evaluated by repeated measures ANOVA model. The differences between subgroups were evaluated using least significant difference multiple comparisons. The statistical significance $p < 0.05$ was chosen for both ANOVA testing and multiple comparisons. Due to non-Gaussian data distribution in all dependent variables, the dependent variables underwent power transformations to attain distributional symmetry and a constant variance in the data as well as in residuals. The statistical software NCSS 2002 (Kaysville, UT, USA) was used for data analysis.

Results

The postprandial responses of the studied hormones are summarized in Table 1. Postprandial plasma obestatin and total ghrelin concentrations significantly decreased compared with preprandial levels and reached their lowest values 90 and 120 min after meal consumption, respectively (80.9 ± 4.89 % and 80.7 ± 4.33 %, respectively, $p < 0.05$). Plasma acyl ghrelin concentrations decreased significantly only in 30. min after the meal (67.7 ± 13.67 %, $p < 0.05$). Plasma desacyl ghrelin concentrations decreased significantly after the breakfast and reached the lowest value 60 min after breakfast (45.3 ± 11.88 %, $p < 0.05$) (Fig. 1). Preprandial ghrelin/obestatin ratio was 5.9 ± 0.5 and there was no significant change in this ratio during the postprandial period. Plasma insulin concentrations increased

Table 1. Pre- (0 min) and postprandial (30, 60, 90, 150 min) plasma levels of the studied hormones.

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
<i>Obestatin (pg/ml)</i>	181±15.3	165±4.76*	159±14.8*	150±17.4*	155±16.9*	162±14.7*
<i>GhreTot (pg/ml)</i>	1053±106	868±83*	865±80.9*	942±110*	850±90.4*	899±88.1*
<i>GhreAcyl (fmol/ml)</i>	11.61±1.54	7.86±1.2*	7.96±1.2	8.95±1.42	11.6±1.94	12.1±1.86
<i>GhreDes (fmol/ml)</i>	95.9±29.5	64.3±15.3*	43.4±7.63*	59.2±11.7*	49.0±8.19*	44.6±11.9*
<i>Ghre/Obest</i>	5.88±0.50	5.35±0.33	5.52±0.32	6.58±0.95	5.58±0.51	5.60±0.35
<i>Insulin (μIU/ml)</i>	5.71±0.75	37.8±5.02*	35.4±2.45*	28.9±2.94*	30.4±4.32*	16.7±2.82*
<i>NPY (pmol/l)</i>	47.5±7.54	-	42.4±7.26	36.9±6.93*	-	36.7±19.6*

GhreTot - Ghrelin total, GhreAcyl - Ghrelin acyl, GhreDes - Ghrelin desacyl, Ghre/Obest - Ghrelin/Obestatin ratio, NPY – neuropeptide Y
 *change in hormone level compared with preprandial status (time 0'), $p < 0.05$

Table 2. Relationship of obestatin, total ghrelin, acyl and desacyl ghrelin with other measured biochemical and hormonal parameters calculated with all six times (0, 30, 60, 90, 120, 150 min.) included.

		Obestatin	GhreTot	GhreAc	GhreDes	Ghr/Ob	Insulin	NPY	BMI
<i>Obestatin</i>	r	-	0.661	0.284	0.460	-0.309	-0.143	0.805	-0.197
	p	-	0.000	0.068	0.002	0.047	0.366	0.000	0.210
<i>GhreTot</i>	r	0.661	-	0.363	0.666	0.414	-0.190	0.490	-0.048
	p	0.000	-	0.018	0.000	0.006	0.228	0.009	0.762
<i>GhreAcyl</i>	r	0.284	0.363	-	0.152	0.033	-0.208	0.449	-0.266
	p	0.068	0.018	-	0.336	0.836	0.187	0.019	0.089
<i>GhreDes</i>	r	0.460	0.666	0.152	-	0.357	-0.105	0.459	0.093
	p	0.002	0.000	0.336	-	0.020	0.506	0.016	0.557
<i>Ghre/Ob</i>	r	-0.309	0.414	0.033	0.357	-	-0.100	-0.303	0.408
	p	0.047	0.006	0.836	0.020	-	0.530	0.124	0.007

GhreTot – Ghrelin total, GhreAcyl – Ghrelin Acyl, GhreDes - Ghrelin desacyl, Ghre/Obest – Ghrelin/Obestatin ratio, NPY – neuropeptide Y, BMI – Body Mass Index, r = correlation coefficient, p = P value (p values <0.05 are in bold)

significantly after the meal with the highest value in 30 min after the meal ($p < 0.05$). Plasma concentrations of NPY were significantly lower than basal levels in 90 and 150 min after the meal ($p < 0.05$).

The relationship of obestatin with the other studied parameters is shown in Table 2. Obestatin was positively related to total ghrelin, desacyl ghrelin and NPY. Total, acyl and desacyl ghrelin correlated positively to each other and also with NPY. Ghrelin/obestatin ratio was positively related to BMI.

Discussion

The present study was designed to investigate

the effect of a high-carbohydrate breakfast consumption on total, acyl and desacyl ghrelin and ghrelin-associated peptide obestatin in healthy normal-weight women. We demonstrated for the first time that plasma obestatin levels significantly decrease after consumption of a high-carbohydrate breakfast in healthy women in a similar fashion as do total, acyl and desacyl ghrelin. The positive relationship of obestatin with total ghrelin in the postprandial period indicates that these two cleavage products of one gene could act in a similar fashion to increase food intake in healthy humans. This idea is further confirmed by the positive correlation between obestatin and orexigen NPY. However, the relationship of obestatin with the desacyl form of ghrelin does not seem

to play with the idea of an orexigenic effect of obestatin (Asakawa *et al.* 2005).

The initially claimed anorexigenic role of obestatin in mice was highly negated by almost all of subsequently published studies (Gourcerol *et al.* 2006, Samson *et al.* 2006, Holst *et al.* 2007, Nogueiras *et al.* 2007, Yamamoto *et al.* 2007, Zizzari *et al.* 2007). No change or a modest reduction (20 %) in plasma obestatin levels has been reported between non-fasted and fasted state in mice (Zhang *et al.* 2005, Zizzari *et al.* 2007). The interaction between obestatin and ghrelin in the regulation of food intake has also been under question. Indeed, while the initial report found that obestatin could reverse the ghrelin-induced stimulation of food intake in fasted mice, such interaction was not confirmed subsequently upon an acute obestatin injection in fed or fasted rats (Seoane *et al.* 2006) or during the 7-day treatment with obestatin in mice (Nogueiras *et al.* 2007). Here we show that obestatin exhibits, similarly to ghrelin, postprandial reduction after a high-carbohydrate meal in healthy women, suggesting rather an additive role of these two peptides in postprandial satiation. Furthermore, we negate previous observation of rapid degradation of circulating obestatin as well as no effect of food intake on circulating obestatin levels.

Regarding human studies, the circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio was elevated in human obesity, whereas two hours postprandially this ratio was unchanged in obese compared to lean (Guo *et al.* 2007), rising the hypothesis that the preprandial ghrelin to obestatin ratio may be of importance in the etiology and pathophysiology of obesity. We found the ghrelin/obestatin ratio to be positively related to BMI in healthy young women, whereas neither ghrelin or obestatin correlated to BMI. This might suggest an interesting role of balance between these two hormones as related to other hormonal, metabolic and anthropometric parameters and needs to be further elucidated. However, based on the data of Chartrel *et al.* (2007), the question about what is really measured in human studies is still unanswered together with the exact role of obestatin as an anorexigenic contraregulator to ghrelin or orexigenic hormone playing in a similar fashion to ghrelin. Bang *et al.* (2007) found no evidence for the existence of obestatin as an unique, endogenous peptide and the data of this study rather suggest that circulating and stored peptides derived from the carboxyl terminal of proghrelin (C-ghrelin) are consistent in length with proghrelin (29-94) and respond to metabolic

manipulation, at least in humans, in similar fashion to ghrelin (1-28). However, our group previously demonstrated that whatever we call immunoreactivity as measured by the Phoenix kit, this molecule is different than ghrelin and exhibits relationships with anthropometric parameters in cases where ghrelin fails to correlate (Hainer *et al.*, unpublished results). It is possible that in certain circumstances, i.e., starvation, the ghrelin gene is cleaved differentially than under physiological conditions. The ratio of ghrelin/obestatin and acyl/desacyl ghrelin may play a role in the regulation of food intake in humans. Another possible explanation of the simultaneous postprandial decrease of obestatin with ghrelin is that the function of obestatin may be to antagonize orexigenic ghrelin action after meal consumption, i.e., some kind of a negative feedback may exist between these two peptides. Our results pointed out the importance of measurement not only of total ghrelin, but also of its acyl and desacyl forms together with other ghrelin gene-derived peptides in order to better interpret the data.

Ghrelin is considered to be an upstream regulator of the orexigenic peptides NPY and AgRP (Rosická *et al.* 2002, Pfaff *et al.* 2004, Miura *et al.* 2006, Dardennes *et al.* 2007). Recent studies demonstrated a significant enhancement of plasma NPY levels after ghrelin injection in humans (Coiro *et al.* 2006) and stimulatory action of ghrelin on NPY gene transcription in vitro (Goto *et al.* 2006). Our results have shown a positive correlation between obestatin, total ghrelin, acyl ghrelin, desacyl ghrelin and NPY. This supports a role of proghrelin-derived peptides in the regulation of food intake and energy storage via NPY, although the mechanisms by which these peptides stimulates NPY neurons are not clear at all.

The postprandial decrease of total ghrelin after a high-carbohydrate breakfast in healthy individuals has been documented several times (Monteleone *et al.* 2003, Blom *et al.* 2005, Marzullo *et al.* 2006). However, what has not yet been established is the role of acyl and desacyl form of ghrelin in the postrandial regulation of satiety. Meal intake significantly suppressed acyl ghrelin by 38 % in healthy humans and serum insulin best predicted plasma acyl ghrelin concentrations accounting for 97 % of its variation (Lucidi *et al.* 2004). In agreement with this, a high-carbohydrate breakfast significantly decreased serum acyl ghrelin levels in healthy individuals (Tentolouris *et al.* 2004). In contrast to acylated ghrelin, desacyl ghrelin was shown to induce

a negative energy balance by decreasing food intake and delaying gastric emptying (Asakawa *et al.* 2005). Central desacyl ghrelin may activate orexin-expressing neurons in mice, perhaps functioning in feeding regulation (Toshinai *et al.* 2006). Our results have shown that not only total ghrelin, but also its acyl and desacyl form as well as obestatin significantly decrease after a high-carbohydrate breakfast. What is the role of the individual reduction of these hormones is highly speculative. One hypothesis which has been postulated is that unacylated ghrelin could be used to blunt the effects of acylated ghrelin (Broglio *et al.* 2004, Gauna *et al.* 2004) and that the ratio of acylated ghrelin and unacylated ghrelin production might help to regulate the balance between adipogenesis and lipolysis in response to nutritional status (Thompson *et al.* 2004). The type of relationship that may exist between ghrelin and obestatin has not yet been established, but it is possible that postprandially,

obestatin may blunt the effect of ghrelin in healthy humans.

In conclusion, we demonstrated that in healthy women plasma obestatin concentrations decrease similarly to ghrelin after a high-carbohydrate breakfast. Further investigation is needed to classify the role of the cleavage products of the ghrelin gene in human physiology.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by grant NR/9158-3 provided by the Czech Ministry of Health. We thank Diana Riegerová, Naděžda Procházková and Jana Novotná for their technical assistance.

References

- ASAKAWA A, INUI A, FUJIMIYA M, SAKAMAKI R, SHINFUKU N, UETA Y, MEGUID MM, KASUGA M: Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* **54**: 18-24, 2005.
- BALDANZI G, FILIGHEDDU N, CUTRUPI S, CATAPANO F, BONISSONI S, FUBINI A, MALAN D, BAJ G, GRANATA R, BROGLIO F, PAPOTTI M, SURICO N, BUSSOLINO F, ISGAARD J, DEGHENGHI R, SINIGAGLIA F, PRAT M, MUCCIOLI G, GHIGO E, GRAZIANI A: Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* **159**: 1029-1037, 2002.
- BANG AS, SOULE SG, YANDLE TG, RICHARDS AM, PEMBERTON CJ: Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma. *J Endocrinol* **192**: 313-323, 2007.
- BASSIL AK, HAGLUND Y, BROWN J, RUDHOLM T, HELLSTROM PM, NASLUND E, LEE K, SANGER GJ: Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* **150**: 58-64, 2007.
- BEDENDI I, ALLOATTI G, MARCANTONI A, MALAN D, CATAPANO F, GHE C, DEGHENGHI R, GHIGO E, MUCCIOLI G: Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol* **476**: 87-95, 2003.
- BILGIN HM, TUMER C, DIKEN H, KELLE M, SERMET A: Role of ghrelin in the regulation of gastric acid secretion in rats. *Physiol Res* 2008 (In press)
- BLOM WA, STAFLEU A, DE GRAAF C, KOK FJ, SCHAAFSMA G, HENDRIKS HF: Ghrelin response to carbohydrate-enriched breakfast is related to insulin. *Am J Clin Nutr* **81**: 367-375, 2005.
- BROGLIO F, GOTTERO C, ARVAT E, GHIGO E: Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Horm Res* **59**: 109-117, 2003.
- BROGLIO F, GOTTERO C, PRODAM F, GAUNA C, MUCCIOLI G, PAPOTTI M, ABRIBAT T, VAN DER LELY AJ, GHIGO E: Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 3062-3065, 2004.
- CASSONI P, PAPOTTI M, GHE C, CATAPANO F, SAPINO A, GRAZIANI A, DEGHENGHI R, REISMANN T, GHIGO E, MUCCIOLI G: Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1738-1745, 2001.

- CARLINI VP, SCHIOTH HB, DEBARIOGLIO SR: Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **352**: 907-912, 2007.
- CHARTREL N, ALVEAR-PEREZ R, LEPRINCE J, ITURRIOZ X, REAUX-LE GOAZIGO A, AUDINOT V, CHOMARAT P, COGE F, NOSJEAN O, RODRIGUEZ M, GALIZZI JP, BOUTIN JA, VAUDRY H, LLORENS-CORTES C: Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science* **315**: 766, 2007.
- COIRO V, SACCANI-JOTTI G, RUBINO P, MANFREDI G, MELANI A, CHIODERA P: Effects of ghrelin on circulating neuropeptide Y levels in humans. *Neuro Endocrinol Lett* **27**: 755-757, 2006.
- DE SMET B, THIJS T, PEETERS TL, DEPOORTERE I: Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. *Neurogastroenterol Motil* **19**: 211-217, 2007.
- DARDENNES RM, ZIZZARI P, TOLLE V, FOULON C, KIPMAN A, ROMO L, IANCU-GONTARD D, BONI C, SINET PM, THERESE BLUET M, ESTOUR B, MOUREN MC, GUELFI JD, ROUILLON F, GORWOOD P, EPELBAUM J: Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. *Psychoneuroendocrinology* **32**: 106-113, 2007.
- DOSTÁLOVÁ I, HALUZÍK M.: The role of ghrelin in the regulation of food intake in patients with obesity and anorexia nervosa. *Physiol Res* 2007 [In press].
- DOSTÁLOVÁ I, SMITKA K, PAPEŽOVÁ H, KVASNIČKOVÁ H, NEDVÍDKOVÁ J: Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol Res* **56**: 587-594, 2007.
- FLANAGAN DE, EVANS ML, MONSOD TP, RIFE F, HEPTULLA RA, TAMBORLANE WV, SHERWIN RS: The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E313-E316, 2003.
- GAUNA C, MEYLER FM, JANSSEN JA, DELHANTY PJ, ABRIBAT T, VAN KOETSVELD P, HOFLAND LJ, BROGLIO F, GHIGO E, VAN DER LELY AJ: Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 5035-5042, 2004.
- GNANAPAVAN S, KOLA B, BUSTIN SA, MORRIS DG, MCGEE P, FAIRCLOUGH P, BHATTACHARYA S, CARPENTER R, GROSSMAN AB, KORBONITS M: The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 2988-2991, 2002.
- GOURCEROL G, MILLION M, ADELSON DW, WANG Y, WANG L, RIVIER J, ST-PIERRE DH, TACHE Y: Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* **27**: 2811-2819, 2006.
- GOTO M, ARIMA H, WATANABE M, HAYASHI M, BANNO R, SATO I, NAGASAKI H, OISO Y: Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *Endocrinology* **147**: 5102-5109, 2006.
- GUO ZF, ZHENG X, QIN YW, HU JQ, CHEN SP, ZHANG Z: Circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio is increased in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 1875-1880, 2007.
- HOLST B, EGEROD KL, SCHILD E, VICKERS SP, CHEETHAM S, GERLACH LO, STORJOHANN L, STIDSEN CE, JONES R, BECK-SICKINGER AG, SCHWARTZ TW: GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* **148**: 13-20, 2007.
- JACKSON VR, NOTHACKER HP, CIVELLI O: GPR39 receptor expression in the mouse brain. *Neuroreport* **17**: 813-816, 2006.
- KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, NAKAZATO M, MATSUO H, KANGAWA K: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656-660, 1999.
- KOJIMA M, HOSODA H, MATSUO H, KANGAWA K: Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* **12**: 118-122, 2001.
- LUCIDI P, MURDOLO G, DI LORETO C, DE CICCIO A, PARLANTI N, FANELLI C, SANTEUSANIO F, BOLLI GB, DE FEO P: Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* **51**: 2911-2014, 2002.

- LUCIDI P, MURDOLO G, DI LORETO C, PARLANTI N, DE CICCO A, RANCHELLI A, FATONE C, TAGLIONI C, FANELLI C, SANTEUSANIO F, DE FEO P: Meal intake similarly reduces circulating concentrations of octanoyl and total ghrelin in humans. *J Endocrinol Invest* **27**: RC12-RC15, 2004.
- MARZULLO P, CAUMO A, SAVIA G, VERTI B, WALKER GE, MAESTRINI S, TAGLIAFERRI A, DI BLASIO AM, LIUZZI A: Predictors of postabsorptive ghrelin secretion after intake of different macronutrients. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 4124-4130, 2006.
- MATSUMOTO M, KITAJIMA Y, IWANAMI T, HAYASHI Y, TANAKA S, MINAMITAKE Y, HOSODA H, KOJIMA M, MATSUO H, KANGAWA K: Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 655-659, 2001.
- MIURA T, MARUYAMA K, SHIMAKURA S, KAIYA H, UCHIYAMA M, KANGAWA K, SHIODA S, MATSUDA K: Neuropeptide Y mediates ghrelin-induced feeding in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci Lett* **407**: 279-283, 2006.
- MONTELEONE P, BENCIVENGA R, LONGOBARDI N, SERRITELLA C, MAJ M: Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* **11**: 5510-5514, 2003.
- MUCCIOLI G, PAPOTTI M, LOCATELLI V, GHIGO E, DEGHENGHI R: Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest* **24**: RC7-RC9, 2001.
- MUCCIOLI G, TSCHOP M, PAPOTTI M, DEGHENGHI R, HEIMAN M, GHIGO E: Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* **440**: 235-254, 2002.
- NEDVÍDKOVÁ J, KRYKORKOVÁ I, BARTÁK V, PAPEŽOVÁ H, GOLD PW, ALESCI S, PACÁK K: Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 1678-1682, 2003.
- NOGUEIRAS R, PFLUGER P, TOVAR S, ARNOLD M, MITCHELL S, MORRIS A, PEREZ-TILVE D, VAZQUEZ MJ, WIEDMER P, CASTANEDA TR, DIMARCH R, TSCHOP M, SCHURMANN A, JOOST HG, WILLIAMS LM, LANGHANS W, DIEGUEZ C: Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* **148**: 21-26, 2007.
- PFAFF DW, PHILLIPS MI, RUBIN RT: *Principles of Hormone/Behaviour Relations*. Elsevier Academic Press, London, 2004, pp 335.
- ROSICKÁ M, KRŠEK M, JARKOVSKÁ Z, MAREK J, SCHREIBER V: Ghrelin – a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiol Res* **51**: 435-441, 2002.
- ROSICKÁ M, KRŠEK M, MATOULEK M, JARKOVSKÁ Z, MAREK J, JUSTOVÁ V, LACINOVÁ Z: Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiol Res* **52**: 61-66, 2003.
- SAMSON WK, WHITE MM, PRICE C, FERGUSON AV: Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am J Physiol* **292**: R637-R643, 2007.
- SEOANE LM, AL-MASSADI O, PAZOS Y, PAGOTTO U, CASANUEVA FF: Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *J Endocrinol Invest* **8**: RC13-RC15, 2006.
- SHIYA T, NAKAZATO M, MIZUTA M, DATE Y, MONDAL MS, TANAKA M, NOZOE S, HOSODA H, KANGAWA K, MATSUKURA S: Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 240-244, 2002.
- TENTOLOURIS N, KOKKINOS A, TSIGOS C, KYRIAKI D, DOUPIS J, RAPTIS SA, KATSILAMBROS N: Differential effects of high-fat and high-carbohydrate content isoenergetic meals on plasma active ghrelin concentrations in lean and obese women. *Horm Metab Res* **36**: 559-563, 2004.
- THOMPSON NM, GILL DA, DAVIES R, LOVERIDGE N, HOUSTON PA, ROBINSON IC, WELLS T: Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* **145**: 234-242, 2004.

- TOSHINAI K, YAMAGUCHI H, SUN Y, SMITH RG, YAMANAKA A, SAKURAI T, DATE Y, MONDAL MS, SHIMBARA T, KAWAGOE T, MURAKAMI N, MIYAZATO M, KANGAWA K, NAKAZATO M: Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* **147**: 2306-2314, 2006.
- TREMBLAY F, PERREAULT M, KLAMAN LD, TOBIN JF, SMITH E, GIMENO RE: Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology* **148**: 501-506, 2007.
- UKKOLA O: Endocrinological activities of ghrelin: new insights. *Eur J Int Med* **14**: 351-356, 2003.
- YAMAMOTO D, IKESHITA N, DAITO R, HERNINGTYAS EH, TODA K, TAKAHASHI K, IIDA K, TAKAHASHI Y, KAJI H, CHIHARA K, OKIMURA Y: Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul Pept* **138**: 141-144, 2007.
- ZHANG JV, REN PG, AVSIAN-KRETCHMER O, LUO CW, RAUCH R, KLEIN C, HSUEH AJ: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* **310**: 996-999, 2005.
- ZIZZARI P, LONGCHAMPS R, EPELBAUM J, BLUET-PAJOT MT: Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* **148**: 1648-1653, 2007.
-

Plasma Obestatin Levels in Normal Weight, Obese and Anorectic Women

H. ZAMRAZILOVÁ¹, V. HAINER¹, D. SEDLÁČKOVÁ¹, H. PAPEŽOVÁ²,
M. KUNEŠOVÁ¹, F. BELLISLE³, M. HILL¹, J. NEDVÍDKOVÁ¹

¹Institute of Endocrinology and ²Eating Disorders Centre, Department of Psychiatry, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ³INSERM U557, CRNH U1125, Id France, Unité de Recherche en Épidémiologie Nutritionnelle, Bobigny, France

Received November 12, 2007

Accepted January 28, 2008

On-line February 13, 2008

Summary

Obestatin is a recently discovered peptide produced in the stomach, which was originally described to suppress food intake and decrease body weight in experimental animals. We investigated fasting plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women and associations of plasma obestatin levels with anthropometric and hormonal parameters. Hormonal (obestatin, ghrelin, leptin, insulin) and anthropometric parameters and body composition were examined in 15 normal weight, 21 obese and 15 anorectic women. Fasting obestatin levels were significantly lower in obese than in normal weight and anorectic women, whereas ghrelin to obestatin ratio was increased in anorectic women. Compared to leptin, only minor differences in plasma obestatin levels were observed in women who greatly differed in the amount of fat stores. However, a negative correlation of fasting obestatin level with body fat indexes might suggest a certain role of obestatin in the regulation of energy homeostasis. A significant relationship between plasma obestatin and ghrelin levels, independent of anthropometric parameters, supports simultaneous secretion of both hormones from the common precursor. Lower plasma obestatin levels in obese women compared to normal weight and anorectic women as well as increased ghrelin to obestatin ratio in anorectic women might play a role in body weight regulation in these pathologies.

Key words

Obestatin • Obesity • Anorexia nervosa • Anthropometric indexes • Body fat

Corresponding author

Vojtěch Hainer, Institute of Endocrinology, Národní třída 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. E-mail: vhainer@endo.cz

Introduction

A new peptide has recently been described and named obestatin by Zhang *et al.* (2005). Similarly to ghrelin, this 23-amino acid peptide is produced in the stomach from the same precursor – proghrelin. In contrast to ghrelin, which acts as an appetite stimulant (Wren *et al.* 2001), treatment of rodents with obestatin suppresses food intake (Zhang *et al.* 2005, Bresciani *et al.* 2006, Green *et al.* 2007, Lagaud *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007), inhibits jejunal contractions and decreases body weight (Zhang *et al.* 2005, Bresciani *et al.* 2006). Recently, several studies have inquired the inhibitory effects of obestatin on food intake and gastrointestinal motility and did not support the concept that obestatin is a physiological opponent of ghrelin (Gourcerol *et al.* 2006, De Smet *et al.* 2007, Holst *et al.* 2007, Tremblay *et al.* 2007). Gourcerol and Taché (2007) summarized experimental evidence that obestatin does not influence food intake and gastrointestinal motility and does not represent the cognate ligand for the orphan GPR-39 receptor. These researchers proposed to rename obestatin as ghrelin-associated peptide. In addition, a recent study concerned to characterisation of proghrelin peptides in human plasma and their distribution in mammalian tissues found no obestatin immunoreactivity in human and rat plasma and rat stomach (Bang *et al.* 2007).

Obese subjects exhibit significantly lower ghrelin levels than healthy normal weight individuals and these levels increase in response to weight loss (Tschöp *et al.* 2001, Cummings *et al.* 2002). In contrast, patients

with anorexia nervosa (AN) have elevated plasma ghrelin levels (Otto *et al.* 2001, Nedvídková *et al.* 2003) which decline with body weight gain (Otto *et al.* 2001). Only a few studies on obestatin levels in human obesity have been published. Decreased obestatin levels were reported in morbidly obese subjects referred to bariatric surgery (Haider *et al.* 2007). Guo *et al.* (2007) described an elevated ratio of circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio in human obesity.

The first aim of our study was to compare obestatin levels in healthy normal weight women (NW) and in female patients with obesity and AN. The second aim of our study was to reveal associations of obestatin levels with ghrelin, leptin and insulin levels. The third aim of the study was to find out correlations of plasma obestatin and ghrelin with body composition and body fat distribution indexes

Methods

Subjects

Study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology in Prague. Before the study, each participant signed an informed consent form. Fifteen normal weight women (BMI: 21.6 ± 0.4 kg/m², range 19.7-24.9 kg/m²; age: 34.7 ± 1.7 years, range 24-45 years), 21 women with grade 2 or 3 obesity (BMI: 39.4 ± 1.2 kg/m², range 35.3-3.8 kg/m²; age: 32.5 ± 1.1 years, range 24-45 years), and 15 women with restrictive type of AN (BMI: 14.9 ± 0.3 kg/m², range 11.9-17.4 kg/m²; age: 23.7 ± 0.9 years, range 18-29 years) were enrolled in this study. Healthy NW and obese women were studied in the follicular phase of the regular menstrual cycle. AN patients were diagnosed according to the 4th edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (American Psychiatric Association, 1994) and were examined after two weeks of in-patient stay in the Department of Psychiatry. AN patients were amenorrhoeic. Subjects with endocrine disorders and type 2 diabetes were excluded from the study. The participants did not take any medication susceptible to affect body weight. Five obese patients with hypertension were treated with angiotensin converting enzyme inhibitors.

Blood tests conducted before initiation of the study confirmed normal values for blood count, fasting blood glucose, and liver and renal function. Participants were recommended to avoid vigorous physical activity during the 14-h period before blood sampling. All

subjects consumed a standardized dinner at 6 pm under supervision, and were then asked to fast overnight. Reported duration of sleep in the night preceding blood sampling was comparable in all studied subjects. Subjects were admitted to the Institute of Endocrinology at 7 am. After physical and ECG examinations, blood samples were collected into chilled tubes containing Na₂EDTA and antilysin. Plasma was immediately separated by centrifugation at 4 °C and stored at -80 °C until being assayed.

After blood withdrawal, anthropometric measurements were carried out according to WHO recommendations (WHO 1995). Body composition was assessed using whole body densitometry (Hologic QDR-2000). Fat mass (FM %), lean body mass (LBM %) and trunk fat (TF kg) were determined.

Hormonal assays

Plasma obestatin immunoreactivity was measured with a commercial RIA kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, U.S.A.), the intra- and interassay variability was 5.0 % and 14.2 %, respectively. The same protocol was used in other clinical studies on obestatin which have been published before (Guo *et al.* 2007, Haider *et al.* 2007, Park *et al.* 2007, Qi *et al.* 2007). Total plasma ghrelin and leptin were determined using commercially available RIA kits (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, U.S.A.), plasma insulin levels using commercial RIA kits of Immunotech, Inc. (Prague, Czech Republic).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Differences between age-adjusted variables were evaluated by an analysis of variance (ANOVA). Spearman correlations were computed. Correlations of obestatin with anthropometric and hormonal characteristics in the whole cohort were adjusted for age, and for BMI and waist circumference respectively. The relationship of waist circumference with obestatin level was evaluated by both Spearman's and Pearson's correlations. The power transformations were completed to attain Gaussian data distribution and a constant variance. The points outside of the 95 % confidence ellipsoid (outliers, n=3) were not included in the correlation analysis.

Results

The anthropometric and hormonal data of the

subjects are reported in Table 1. BMI, body weight, waist circumference, fat mass and trunk fat were higher in obese and lower in AN patients in comparison with NW subjects. Plasma leptin and insulin levels were elevated in obese and reduced in AN patients compared with NW subjects. Plasma ghrelin levels were lower in obese and higher in AN patients. Plasma obestatin levels were lower in obese women compared with NW subjects and with AN patients. Ghrelin to obestatin ratio was significantly higher ($p < 0.05$) in AN patients (5.9 ± 0.7) than in obese and NW women. This ratio in obese patients (4.1 ± 0.3) did not significantly differ from NW women (3.6 ± 0.2). The decrease in obestatin levels in obese (25 %) and the lack of change in obestatin levels in AN women contrasts with leptin levels which exhibited several fold changes in obese (3.7 fold increase) and AN (6.2 fold decrease) women. Similarly, ghrelin increases by 1.8 fold in AN compared with NW subjects while there were no significant changes in obestatin levels. In obese patients, obestatin levels decreases by 25 % while changes in ghrelin levels (-19 %) did not reach statistical significance. Spearman's correlations of plasma obestatin with anthropometric and hormonal characteristics are shown in Table 2. In NW women, significant negative correlations of body weight, waist circumference, body fat (%), and truncal fat (kg) with the plasma obestatin level were demonstrated whereas LBM correlated positively with obestatin. A significant negative correlation of obestatin with BMI was shown in AN patients. The negative associations of body fat indexes and positive association of LBM with plasma obestatin was shown in the whole cohort after adjustment for age. Figure 1 illustrates a significant negative correlation between waist circumference and obestatin in the whole population (Pearson's correlation after power transformation of both variables: $r = -0.736$, $p < 0.001$). A significant positive relationship between obestatin and ghrelin was observed in the obese group ($r = 0.587$, $p = 0.002$) and a correlation of borderline significance between these two hormones was revealed in NW women ($r = 0.500$, $p = 0.058$). A significant relation of plasma obestatin to plasma leptin ($r = -0.514$, $p = 0.05$) was revealed in NW women, whereas only in obese patients plasma obestatin correlated with insulin ($r = -0.457$, $p = 0.037$). If the data were adjusted for BMI, waist circumference and age in the whole cohort, only correlation of obestatin with ghrelin remained significant, whereas significance disappeared for other hormonal indexes.

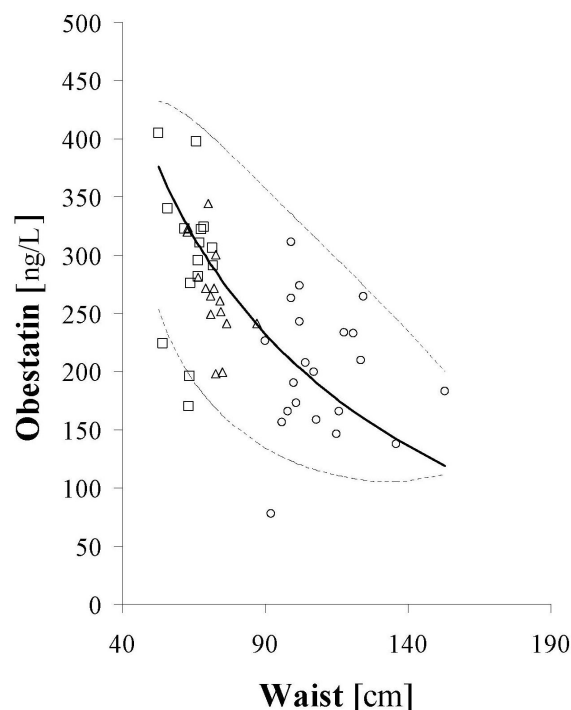


Fig. 1. Relationship between waist circumference and obestatin serum levels for the groups of anorexic women (squares, $n=15$), women with normal body weight (triangles, $n=15$), and obese women (circles, $n=21$). The full and dotted curves represent principal axis and 95% confidence ellipsoid, respectively as were calculated from the data after power transformations of both variables and re-transformed to the original scale. The power transformations were completed to attain Gaussian data distribution and a constant variance. The point outside of the 95% confidence ellipsoid (outliers, $n=3$) were not included in the correlation analysis. Spearman's correlation: $r = -0.716$, $p < 0.001$ ($n=48$). Pearson's correlation (after power transformations of both variables): $r = -0.736$, $p < 0.001$ ($n=48$).

Discussion

Our study compared fasting plasma obestatin levels in healthy NW women, female patients with obesity and AN. Associations of plasma obestatin levels with selected anthropometric and hormonal indexes were also investigated.

Lower plasma obestatin levels were found in obese subjects compared with NW women and AN patients. These findings agree partly with the study by Guo *et al.* (2007), in which preprandial obestatin levels were lower in obese men and women. In contrast with our results that study found the higher ghrelin to obestatin ratio in the obese group (Guo *et al.* 2007). Lower obestatin levels in comparison with NW controls were also reported in severely obese subjects referred to bariatric surgery (Haider *et al.* 2007). We failed to reveal any significant differences in obestatin levels between

Table 1. Anthropometric and hormonal characteristics of participants

Variable	NW (n = 15)	Obese (n = 21)	AN (n = 15)
Age (years)	34.7±1.7	32.5±1.1	23.7±0.9 ^{a b}
BMI (kg/m ²)	21.6±0.4	39.4±1.2 ^a	14.9±0.3 ^{a b}
BW (kg)	60.1±1.5	108.9±4.2 ^a	41.2±1.3 ^{a b}
Waist (cm)	72.8±1.5	109.7±3.4 ^a	64.7±1.3 ^{a b}
FM (%)	32.5±1.2	53.6±1.1 ^a	11.6±1.3 ^{a b}
LBM (%)	66.8±4.5	45.8±1.6 ^a	87.6±1.1 ^{a b}
TF (kg)	6.7±0.7	29.5±1.4 ^a	0.8±0.2 ^{a b}
Obestatin (ng/l)	267.9±10.8	200.9±11.9 ^a	297.5±16.7 ^b
Total ghrelin (ng/l)	964.9±59.9	781.8±38.6	1732.9±236.3 ^{a b}
Leptin (µg/l)	14.3±1.7	52.7±5.6 ^a	2.3±0.3 ^{a b}
Insulin (mU/l)	6.7±0.7	14.0±1.8 ^a	3.6±0.7 ^{a b}

Data are expressed as mean±SEM. ^a $P < 0.05$ Obese/AN vs. NW; ^b $P < 0.05$ AN vs. Obese; AN - women with anorexia nervosa; BMI - body mass index; BW - body weight; FM - fat mass; LBM - lean body mass; NW - normal weight women; TF - trunk fat.

Table 2. Spearman's correlations between obestatin and selected anthropometric, body composition and hormonal characteristics in normal weight (NW), obese and anorectic (AN) women and in all subjects with adjusted data (ALL). Correlations between obestatin and anthropometric variables were adjusted for age (^a) and correlations between obestatin and hormonal characteristics are shown after adjustment for age, BMI and waist circumference (^{abw})

Variable		NW (n=15)	Obese (n=21)	AN (n=15)	ALL (n=51)
BMI	r	-0.257	-0.160	-0.567	-0.646 ^a
(kg/m ²)	p	0.356	0.489	0.028	< 0.001
BW	r	-0.711	-0.206	-0.247	-0.641 ^a
(kg)	p	0.003	0.371	0.376	< 0.001
Waist	r	-0.769	0.014	-0.043	-0.603 ^a
(cm)	p	0.001	0.951	0.907	< 0.001
FM	r	-0.525	-0.169	0.150	-0.498 ^a
(%)	p	0.044	0.563	0.700	0.002
LBM	r	0.532	0.187	-0.517	0.476 ^a
(%)	p	0.041	0.523	0.154	0.003
TF	r	-0.586	-0.024	-0.250	-0.525 ^a
(kg)	p	0.021	0.935	0.516	0.001
Total ghrelin	r	0.500	0.587	0.364	0.494 ^{abw}
(ng/l)	p	0.058	0.002	0.182	< 0.001
Leptin	r	-0.514	0.257	-0.231	0.164 ^{abw}
(µg/l)	p	0.050	0.375	0.408	0.227
Insulin	r	-0.207	-0.457	0.022	-0.146 ^{abw}
(mU/l)	p	0.459	0.037	0.943	0.261

r = correlation coefficient, p = P value, ^a = adjusted for age, ^{abw} = adjusted for age, BMI and waist circumference, BMI - body mass index; BW - body weight; FM - fat mass; LBM - lean body mass; TF - trunk fat.

AN and NW women. However, the higher ghrelin to obestatin ratio in AN might reflect a long-term reduction in energy intake which could contribute to susceptibility of AN women to bulimic episodes. The differences in anthropometric and hormonal parameters between anorectic subjects and the other groups remained significant after adjustment for age and so the effect is not age related. Minor differences in plasma obestatin levels between women who greatly differ in energy balance and amount of fat stores infirm major role of this novel hormone in energy homeostasis. Nevertheless, an observed significant negative correlation of fasting obestatin level with total and truncal body fat indexes as well as with plasma leptin level together with the positive correlation between obestatin and LBM might suggest a role of obestatin in body weight regulation under physiological conditions. A lack of significant correlation between obestatin and BMI in normal weight subjects might reflect discordant associations of obestatin with fat mass and LBM and the fact that BMI does not distinguish fat mass from LBM. No relationship between baseline obestatin levels and the BMI SDS was recently reported in obese children (Park *et al.* 2007). The absence of correlation between plasma obestatin and anthropometric and body composition data in our obese group could be related to suppressed fasting obestatin levels in obesity which might be a marker of disrupted regulation of fat stores. A negative correlation between plasma obestatin levels and BMI in AN may suggest a contribution of obestatin in determining body weight in this pathology. A lack of correlations of body composition parameters with obestatin in women with AN is partly due to the narrow range of values of FM and LBM, which are both low due to nutritional deficiency.

A significant simultaneous increase of both plasma ghrelin and obestatin levels was demonstrated with weight loss in morbidly obese patients 6 months after gastric banding (Haider *et al.* 2007). The positive correlation between plasma ghrelin and obestatin revealed both in the group of obese women and in the whole cohort supports a hypothesis of simultaneous secretion of these two hormones from the common precursor. This might result in a mutual balance in the appetite regulation activities of ghrelin and obestatin. Correlation of obestatin with ghrelin remained significant when the data were controlled for age, BMI and waist circumference. This means that an association of obestatin with ghrelin exists independently of anthropometric indexes. Recent experimental studies

brought discordant results concerning the role of obestatin in regulation of energy homeostasis. Some of the studies (Bresciani *et al.* 2006, Green *et al.* 2007, Lagaud *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007) partly confirmed the original findings of Zhang *et al.* (2005), but others failed to confirm the original data (Gourcerol *et al.* 2006, De Smet *et al.* 2007, Gourcerol and Taché 2007, Holst *et al.* 2007, Tremblay *et al.* 2007).

In agreement with previous reports (Otto *et al.* 2001, Tschop *et al.* 2001, Cummings *et al.* 2002, Nedvídková *et al.* 2003, Rosická *et al.* 2003), in our study plasma ghrelin levels were significantly higher in AN patients and lower in obese patients in comparison with NW women.

An inverse relationship between obestatin and insulin levels was revealed in our obese group. Only a few clinical data are available about the association between plasma obestatin and insulin levels. Park *et al.* (2007) measured plasma obestatin, ghrelin and insulin levels during a glucose tolerance test and evaluated the area under the curve (AUC) after a glucose challenge in obese children. A negative correlation of borderline significance between the AUC of obestatin and insulin was shown in control group of obese children ($r=-0.331$, $p=0.09$). According to Qi *et al.* (2007) decreasing concentrations of obestatin are independently and significantly associated with impaired glucose regulation and type 2 diabetes. More studies are required to evaluate a potential role of insulin in obestatin regulation comparable to that demonstrated in ghrelin regulation.

In conclusion, we found that obese women have lower levels of obestatin compared to NW and AN women whereas ghrelin to obestatin ratio was increased in AN women. The observed significant relationship of fasting obestatin level with body composition measures found in NW women and in the whole cohort was absent in obese women probably as a consequence of suppressed secretion of obestatin in obesity. However, the potential physiological role of obestatin in body weight regulation requires further elucidation.

Abbreviations

AN	anorexia nervosa
AUC	area under the curve
BMI	body mass index
BW	body weight
FM	fat mass
LBM	lean body mass
NW	normal weight
TF	trunk fat

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grant NR 7800-4 provided by the Czech Ministry of Health and by Research Aim MSM0021620816.

References

- BANG AS, SOULE SG, YANDLE TG, RICHARDS AM, PEMBERTON CJ: Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma. *J Endocrinol* **192**: 313-323, 2007.
- BRESCIANI E, RAPETTI D, DONA F, BULGARELLI I, TAMIAZZO L, LOCATELLI V, TORSSELLO A: Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosteroid secretion in the rat. *J Endocrinol Invest* **29**: RC16-RC18, 2006.
- CUMMINGS DE, WEIGLE DS, FRAYO RS, BREEN PA, MA MK, DELLINGER EP, PURNELL JQ: Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* **346**: 1623-1630, 2002.
- DE SMET B, THIJS T, PEETERS TL, DEPOORTERE I: Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. *Neurogastroenterol Motil* **19**: 211-217, 2007.
- GREEN BD, IRWIN N, FLATT PR: Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. *Peptides* **28**: 981-987, 2007.
- HOLST B, EGEROD KL, SCHILD E, VICKERS SP, CHEETHAM S, GERLACH LO, STORJOHANN L, STIDSEN CE, JONES R, BECK-SICKINGER AG, SCHWARTZ TW: GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* **148**: 13-20, 2007.
- GOURCEROL G, MILLION M, ADELSON DW, WANG Y, WANG L, RIVIER J, ST-PIERRE DH, TACHE Y: Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* **27**: 2811-2819, 2006.
- GOURCEROL G, TACHÉ Y: Obestatin - a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility. *Neurogastroenterol Motil* **19**: 161-165, 2007.
- GUO ZF, ZHENG X, QIN YW, HU JQ, CHEN SP, ZHANG Z: Circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio is increased in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 1875-1880, 2007.
- HAIDER DG, SCHINDLER K, PRAGER G, BOHDJALIAN A, LUGER A, WOLZT M, LUDVIK B: Serum retinol-binding protein-4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 1168-1171, 2007.
- LAGAUD GJ, YOUNG A, ACENA A, MORTON MF, BARRETT TD, SHANKLEY NP: Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* **357**: 264-269, 2007.
- NEDVÍDKOVÁ J, KRYKORKOVÁ I, BARTÁK V, PAPEŽOVÁ H, GOLD PW, ALESCI S, PACÁK K: Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 1678-1682, 2003.
- OTTO B, CUNTZ U, FRUEHAUF E, WAWARTA R, FOLWACZNY C, RIEPL RL, HEIMAN ML, LEHNERT P, FICHTER M, TSCHOP M: Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* **145**: 669-673, 2001.
- PARK WH, OH YJ, KIM GY, KIM SE, PAIK KH, HAN SJ, KIM AH, CHU SH, KWON EK, KIM SW, JIN DK: Obestatin is not elevated or correlated with insulin in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 229-234, 2007.
- QI X, LI L, YANG G, LI K, TANG Y, LIOU H, BODEN G: Circulating obestatin levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* **66**: 593-597, 2007.
- ROSICKÁ M, KRŠEK M, MATOULEK M, JARKOVSKÁ Z, MAREK J, JUSTOVÁ V, LACINOVÁ Z: Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiol Res* **52**: 61-66, 2003.

-
- TSCHOP M, WEYER C, TATARANNI PA, DEVANARAYAN V, RAVUSSIN E, HEIMAN ML: Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* **50**: 707-709, 2001.
- TREMBLAY F, PERREAULT M, KLAMAN LD, TOBIN JF, SMITH E, GIMENO RE: Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology* **148**: 501-506, 2007.
- WHO Expert Committee Physical status: *The use and interpretation of anthropometry*, pp 452. Geneva: WHO Technical Series Report No. 854, 1995.
- WREN AM, SEAL LJ, COHEN MA, BRYNES AE, FROST GS, MURPHY KG, DHILLO WS, GHATEI MA, BLOOM SR: Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 5992-5995, 2001.
- ZHANG JV, REN P-G, AVSIAN-KRETCHMER O, LUO CH-W, RAUCH R, KLEIN C, HSUEH AJW: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* **310**: 996-999, 2005.
- ZHANG JV, KLEIN C, REN PG, KASS S, VER DONCK L, MOECHARS D, HSUEH AJW: Response to comment on „Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake“. *Science* **315**: 766, 2007.
-

SHORT COMMUNICATION

Serum Visfatin Levels in Patients with Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa

I. DOSTÁLOVÁ¹, D. SEDLÁČKOVÁ², H. PAPEŽOVÁ³, J. NEDVÍDKOVÁ², M. HALUZÍK¹

¹Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague,

²Institute of Endocrinology, Laboratory of Clinical and Experimental Neuroendocrinology, Prague,

³Department of Psychiatry, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic

Received September 8, 2008

Accepted November 18, 2008

On-line December 17, 2008

Summary

Visfatin is an adipose tissue-derived hormone shown to correlate with visceral fat mass in patients with obesity. Its possible role in patients with different types of eating disorders is unknown. We measured fasting serum levels of visfatin and leptin and surrogate measures of insulin sensitivity in 10 untreated patients with anorexia nervosa (AN), 10 untreated patients with bulimia nervosa (BN) and 20 age-matched healthy women (C) to study the possible role of visfatin in these disorders. Patients with AN had severely decreased body mass index (BMI) and body fat content. BMI of BN group did not significantly differ from that of C group, whereas body fat content of BN group was significantly lower compared to C and higher compared to AN group, respectively. Serum glucose levels did not significantly differ among the groups studied, whereas serum insulin and leptin levels and HOMA index were significantly decreased in AN group relative to both C and BN group. In contrast, serum visfatin levels in both patients with AN and BN did not differ from those of C group. We conclude that circulating visfatin levels are not affected by the presence of chronic malnutrition in AN or binge/purge eating behavior in BN.

Key words

Anorexia nervosa • Bulimia nervosa • Visfatin • Adipose tissue

Corresponding author

M. Haluzik, Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, U Nemocnice 1, 128 00 Prague 2, Czech Republic.
E-mail: mhalu@lf1.cuni.cz

Visfatin is a novel adipokine originally described to be produced predominantly by visceral adipose tissue and to exert insulin-mimetic and adipogenic effects (Fukuhara *et al.* 2005). Contrary to the initial report (Fukuhara *et al.* 2005), further studies concerning the association of visfatin with obesity and diabetes have brought up controversial results (Haider *et al.* 2006, Jian *et al.* 2006, Lopez-Bermejo *et al.* 2006, Chen *et al.* 2007, Dogru *et al.* 2007, Sandeep *et al.* 2007, Varma *et al.* 2007). Furthermore, the predominant contribution of visceral over subcutaneous fat depot to serum visfatin in humans has been questioned by some studies (Berndt *et al.* 2007). The effect of weight loss on circulating concentrations of visfatin in obese patients has been numerous documented, but the results are rather conflicting (Haider *et al.* 2006, Krzyzanowska *et al.* 2006, Manco *et al.* 2007).

It is currently unclear whether visfatin represents a marker of fat mass and/or function or whether it may also exert a direct regulatory role in energy metabolism. To our best knowledge, the changes and possible role of visfatin in the pathophysiology of eating disorders have not been described so far. The restrictive form of anorexia nervosa (AN) represents an extreme example of psychosomatic-based malnutrition induced by chronically decreased food intake caused by inappropriate fear of obesity and distorted body image (DSM-IV 1994). As a consequence of this abnormal self-body attitude, the severe weight and fat loss occurs in these patients.

Bulimia nervosa (BN) is an eating disorder characterized, in contrast to AN, by normal or even slightly higher body mass index (BMI). Patients with BN suffer from repeated episodes of binge eating combined with inappropriate compensatory behavior to prevent weight gain such as self-induced vomiting, misuse of laxatives, diuretics, fasting, and excessive exercise (DSM-IV 1994). The presence of either AN or BN affects body weight and fat mass and consequently energy metabolism differently, but both eating disorders are associated with alterations of various hormones, including adipokines (Baranowska *et al.* 2001, Monteleone *et al.* 2002, Housová *et al.* 2005, Dostálová *et al.* 2006, Křížová *et al.* 2007, Haluzíková *et al.* 2008). These endocrine abnormalities might contribute to the pathophysiology of AN and BN (Dostálová *et al.* 2006, 2007, Modan-Moses *et al.* 2007, Doležalová *et al.* 2007).

We measured circulating concentrations of visfatin in 10 previously untreated female patients with restrictive subtype of AN, 10 previously untreated female patients with BN and 20 age-matched healthy women to study its possible role in the pathophysiology of eating disorders. The characteristic of the study subjects is shown in Table 1.

The diagnosis of eating disorders was based on the diagnostic system (DSM-IV 1994). A clinical evaluation of the patients was performed by an experienced psychiatrist. The structured Clinical Interview MINI 5.0 was used for diagnostic assessment of patients. Patients were hospitalized on the Department of Psychiatry throughout the study. None of the studied subjects suffered from diabetes mellitus, thyroid disorder, and/or acute infectious disorder. All patients with AN had amenorrhea, whereas all patients with BN and healthy women were examined in the follicular phase of the menstrual cycle. Body weight of studied patients remained stable for at least three months prior the study. Written informed consent was provided by all participants before being enrolled in the study. The study was approved by the Human Ethical Review Committee, Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, and was performed in accordance with the guidelines proposed in the Declaration of Helsinki.

All subjects were measured and weighed. Body fat content was estimated by bioimpedance analysis (Bodystat 1500, Bodystat Ltd., UK). Blood samples for visfatin evaluation were withdrawn between 7 and 8 h a.m. after 12 h of overnight fasting into tubes with aprotinin (500 U/liter). The serum was separated by

Table 1. Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of the studied subjects.

	Controls (n = 20)	AN (n = 10)	BN (n = 10)
Age (years)	22.6 ± 0.45	23.2 ± 1.21	21.2 ± 0.85
BMI (kg/m ²)	21.8 ± 0.36	14.5 ± 0.46* ⁺	20.1 ± 0.72
Body fat content (%)	23.7 ± 1.34	6.3 ± 1.13* ⁺	13.8 ± 1.73*
Fasting insulin (mIU/l)	6.9 ± 0.93	2.2 ± 0.29*	4.6 ± 0.18
Fasting glucose (mmol/l)	4.7 ± 0.12	4.2 ± 0.12	4.2 ± 0.08
HOMA-R	1.4 ± 0.19	0.4 ± 0.06*	0.9 ± 0.05
Fasting visfatin (ng/ml)	44.0 ± 6.27	37.9 ± 6.52	39.8 ± 2.90
Fasting leptin (ng/ml)	5.6 ± 0.64	1.7 ± 0.34* ⁺	5.0 ± 0.76

Values are expressed as mean ± S.E.M.; AN = anorexia nervosa; BN = bulimia nervosa; BMI = body mass index; HOMA-R = homeostasis model assessment of insulin resistance. *p<0.05 vs. C group; ⁺p<0.05 vs. BN group.

centrifugation and stored at -80 °C until being assayed. Serum visfatin concentrations were measured by a commercial EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., CA, USA). The sensitivity was 1.8 ng/ml, and the intra- and interassay variability was 5 % and 14 %, respectively. Serum insulin concentrations were measured by commercial RIA kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France). Sensitivity was 2.0 µIU/ml, and the intra- and interassay variability was 4.2 and 8.8 %, respectively. Serum glucose concentrations were measured in the Department of Biochemistry of General University Hospital by standard laboratory methods. Homeostasis model assessment (HOMA-R) index was calculated as previously described (Matthews *et al.* 1985) using the following formula: fasting serum insulin (mIU/l) x fasting serum glucose (mmol/l)/22.5. The statistical analysis was performed on SigmaStat Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA). The results are expressed as means ± S.E.M. The groups were compared by one-way ANOVA on ranks. Differences between groups were evaluated using unpaired t-test and Mann-Whitney rank sum test as appropriate.

The main results of the study are summarized in Table 1. Patients with AN were extremely malnourished

as evidenced by severely decreased BMI, percent of body fat and reduced serum leptin levels. BMI of BN group did not significantly differ from that of C group, whereas percent body fat of BN group was significantly lower and higher as compared to C and AN group, respectively. Fasting serum visfatin levels in either AN or BN group were not significantly different as compared to control group. Fasting serum glucose levels did not significantly differ among the groups studied, whereas fasting serum insulin and leptin levels were significantly decreased in patients with AN relative to both C and BN group. Serum insulin and leptin levels in BN group tended to be lower relative to C and higher relative to AN group, respectively, but these differences did not reach statistical significance. HOMA index values paralleled serum insulin levels, being markedly decreased in AN group, whereas no significant difference between BN and C group was found (Table 1).

The reduction of BMI significantly correlated with the changes of circulating visfatin levels after weight loss in some (Haider *et al.* 2006, Choi *et al.* 2007), but not in all previous studies (Krzyzanowska *et al.* 2006). However, all these studies were performed in obese patients undergoing bariatric surgery (Haider *et al.* 2006, Krzyzanowska *et al.* 2006, Garcia-Fuentez *et al.* 2007, Manco *et al.* 2007) or low-caloric diet combined with exercise training program (Choi *et al.* 2007). The groups of patients as well as the conditions of these studies are thus absolutely incomparable with chronic malnutrition of our patients with AN. Here we show that circulating levels of visfatin are not primarily related to the specific eating disorder. Furthermore, unchanged visfatin levels in

patients with AN and BN do not support the thesis that visceral fat mass is a major determinant of this hormone in patients with these eating disorders (Zamboni *et al.* 1997). An alternative explanation could be that circulating levels of visfatin may not accurately reflect its production and/or function in peripheral tissues, including adipose tissue. We and others have previously shown that circulating levels of adipokines do not necessarily mirror its tissue levels (Hotamisligil and Spiegelman 1994, Dostálová *et al.* 2006, Doležalová *et al.* 2007). Thus, we can not exclude the possibility that, although circulating levels of visfatin are unchanged, local visfatin effects (e.g., glucose uptake by adipocytes) within the adipose tissue might be altered in patients with eating disorders. Another possible explanation of unaltered visfatin levels in patients with AN could lie in the differences in its clearance in patients with AN (Fukuhara *et al.* 2005, Berndt *et al.* 2007).

In summary, our data show that circulating visfatin levels are not affected either by the presence of chronic malnutrition in patients with anorexia nervosa or binge/purge eating behavior in patients with bulimia nervosa. Further investigation is needed to clarify the possible role of visfatin in eating disorders or its metabolic complications.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by IGA MHCR no. NR9158-3, MZO 0064165 and MSM0021620814.

References

- BARANOWSKA B, WOLINSKA-WITORT E, WASILEWSKA-DZIUBINSKA E, ROGUSKI K, CHMIELOWSKA M: Plasma leptin, neuropeptide Y (NPY) and galanin concentrations in bulimia nervosa and in anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett* **22**: 356-358, 2001.
- BERNDT J, KLOTING N, KRALISCH S, KOVACS P, FASSHAUER M, SCHON MR, STUMVOLL M, BLUHER M: Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* **54**: 2911-2916, 2007.
- CHEN CC, LI TC, LI CI, LIU CS, LIN WY, WU MT, LAI MM, LIN CC: The relationship between visfatin levels and anthropometric and metabolic parameters: association with cholesterol levels in women. *Metabolism* **56**: 1216-1220, 2007.
- CHOI KM, KIM JH, CHO GJ, BAIK SH, PARK HS, KIM SM: Effect of exercise training on plasma visfatin and eotaxin levels. *Eur J Endocrinol* **157**: 437-442, 2007.
- DSM-IV: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed. American Psychiatric Association, Washington, DC, 1994.

- DOGRU T, SONMEZ A, TASCI I, BOZOGLU E, YILMAZ MI, GENÇ H, ERDEM G, GOK M, BINGOL N, KILIC S, OZGURTAS T, BINGOL S: Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Practice* **76**: 24-29, 2007.
- DOLEŽALOVÁ R, LACINOVÁ Z, DOLINKOVÁ M, KLEIBLOVÁ P, HALUZÍKOVÁ D, HOUSA D, PAPEŽOVÁ H, HALUZÍK M: Changes of endocrine function of adipose tissue in anorexia nervosa: comparison of circulating levels versus subcutaneous mRNA expression. *Clin Endocrinol* **67**: 674-678, 2007.
- DOSTÁLOVÁ I, KUNEŠOVÁ M, DUŠKOVÁ J, PAPEŽOVÁ H, NEDVÍDKOVÁ J: Adipose tissue resistin levels in patients with anorexia nervosa. *Nutrition* **22**: 977-983, 2006.
- DOSTÁLOVÁ I, SMITKA K, PAPEŽOVÁ H, KVASNIČKOVÁ H, NEDVÍDKOVÁ J: Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol Res* **56**: 587-594, 2007.
- FUKUHARA A, MATSUDA M, NISHIZAWA M, SEGAWA K, TANAKA M, KISHIMOTO K, MATSUKI Y, MURAKAMI M, ICHISAKA T, MURAKAMI H, WATANABE E, TAKAGI T, AKIYOSHI M, OHTSUBO T, KIHARA S, YAMASHITA S, MAKISHIMA M, FUNAHASHI T, YAMANAKA S, HIRAMATSU R, MATSUZAWA Y, SHIMOMURA I: Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* **307**: 426-430, 2005.
- GARCIA-FUENTES E, GARCIA-ALMEIDA JM, GARCIA-ARNES J, GARCIA-SERRANO S, RIVAS-MARIN J, GALLEGU-PERALES JL, ROJO-MARTÍNEZ G, GARRIDO-SÁNCHEZ L, BERMUDEZ-SILVA FJ, RODRÍGUEZ DE FONSECA F, SORIGUER F: Plasma visfatin concentrations in severely obese subjects are increased after intestinal bypass. *Obesity (Silver Spring)* **15**: 2391-2395, 2007.
- HAIDER DG, SCHINDLER K, SCHALLER G, PRAGER G, WOLZT M, LUDVIK B: Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 1578-1581, 2006.
- HALUZÍKOVÁ D, DOSTÁLOVÁ I, KAVALKOVÁ P, ROUBÍČEK T, MRÁZ M, PAPEŽOVÁ H, HALUZÍK M: Serum concentrations of adipocyte fatty acid binding protein in patients with anorexia nervosa. *Physiol Res* **58**: 577-581, 2009.
- HOTAMISLIGIL GS, SPIEGELMAN BM: Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* **43**: 1271-1278, 1994.
- HOUSOVÁ J, ANDERLOVÁ K, KŘÍŽOVÁ J, HALUZÍKOVÁ D, KŘEMEN J, KUMSTYROVÁ T, PAPEŽOVÁ H, HALUZÍK M: Serum adiponectin and resistin concentrations in patients with restrictive and binge/purge form of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 1366-1370, 2005.
- JIAN WX, LUO TH, GU YY, ZHANG HL, ZHENG S, DAI M, HAN JF, ZHAO Y, LI G, LUO M: The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population. *Diabet Med* **23**: 967-973, 2006.
- KŘÍŽOVÁ J, DOLINKOVÁ M, LACINOVÁ Z, SULEK S, DOLEŽALOVÁ R, HOUSOVÁ J, KRAJÍČKOVÁ J, HALUZÍKOVÁ D, BOŠANSKÁ L, PAPEŽOVÁ H, HALUZÍK M: Adiponectin and resistin gene polymorphisms in patients with anorexia nervosa and obesity and its influence on metabolic phenotype. *Physiol Res* **57**: 539-546, 2008.
- KRZYŻANOWSKA K, MITTERMAYER F, KRUGLUGER W, KOPP HP, SCHERNTHANER G: Increase in visfatin after weight loss induced by gastropastic surgery. *Obesity (Silver Spring)* **14**: 1886-1889, 2006.
- LOPEZ-BERMEJO A, CHICO-JULIA B, FERNANDEZ-BALSELLS M, RECASENS M, ESTEVE E, CASAMITJANA R, RICART W, FERNANDEZ-REAL JM: Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration. *Diabetes* **55**: 2871-2875, 2006.
- MANCO M, FERNANDEZ-REAL JM, EQUITANI F, VENDRELL J, VALERA MORA ME, NANNI G, TONDOLO V, CALVANI M, RICART W, CASTAGNETO M, MINGRONE G: Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 483-490, 2007.
- MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**: 412-419, 1985.

- MODAN-MOSES D, STEIN D, PARIENTE C, YAROSLAVSKY A, RAM A, FAIGIN M, LOEWENTHAL R, YISSACHAR E, HEMI R, KANETY H: Modulation of adiponectin and leptin during refeeding of female anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 1843-1847, 2007.
- MONTELEONE P, MARTIADIS V, COLURCIO B, MAJ M: Leptin secretion is related to chronicity and severity of the illness in bulimia nervosa. *Psychosom Med* **64**: 874-879, 2002.
- SANDEEP S, VELMURUGAN K, DEEPA R, MOHAN V: Serum visfatin in relation to visceral fat, obesity, and type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. *Metabolism* **56**: 565-570, 2007.
- VARMA V, YAO-BORENGASSER A, RASOULI N, BODLES AM, PHANAVANH B, LEE MJ, STARKS T, KERN LM, SPENCER HJ 3RD, MCGEHEE RE JR, FRIED SK, KERN PA: Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 666-672, 2007.
- ZAMBONI M, ARMELLINI F, TURCATO E, TODISCO P, GALLAGHER D, DALLE GRAVE R, HEYMSFIELD S, BOSELLO O: Body fat distribution before and after weight gain in anorexia nervosa. *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**: 33-36, 1997.
-

Changes of Plasma Obestatin, Ghrelin and NPY in Anorexia and Bulimia Nervosa Patients Before and After a High-Carbohydrate Breakfast

D. SEDLÁČKOVÁ¹, J. KOPEČKOVÁ¹, H. PAPEŽOVÁ², S. VYBÍRAL³,
H. KVASNIČKOVÁ¹, M. HILL¹, J. NEDVÍDKOVÁ¹

¹Institute of Endocrinology, Laboratory of Clinical and Experimental Neuroendocrinology, Prague, Czech Republic, ²Charles University, Department of Psychiatry, First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic, ³Charles University, Faculty of Natural Sciences, Prague, Czech Republic

Received December 30, 2009

Accepted June 14, 2010

On-line October 15, 2010

Summary

Peptides ghrelin, obestatin and neuropeptide Y (NPY) play an important role in regulation of energy homeostasis, the imbalance of which is associated with eating disorders anorexia (AN) and bulimia nervosa (BN). The changes in ghrelin, obestatin and NPY plasma levels were investigated in AN and BN patients after administration of a high-carbohydrate breakfast (1604 kJ). Eight AN women (aged 25.4±1.9; BMI: 15.8±0.5), thirteen BN women (aged 22.0±1.05; BMI: 20.1±0.41) and eleven healthy women (aged 25.1±1.16; BMI: 20.9±0.40) were recruited for the study. We demonstrated increased fasting ghrelin in AN, but not in BN patients, while fasting obestatin and NPY were increased in both AN and BN patients compared to the controls. Administration of high-carbohydrate breakfast induced a similar relative decrease in ghrelin and obestatin plasma levels in all groups, while NPY remained increased in postprandial period in both patient groups. Ghrelin/obestatin ratio was lower in AN and BN compared to the controls. In conclusions, increased plasma levels of fasting NPY and its unchanged levels after breakfast indicate that NPY is an important marker of eating disorders AN and BN. Different fasting ghrelin and obestatin levels in AN and BN could demonstrate their diverse functions in appetite and eating suppression.

Key words

Anorexia and bulimia nervosa • Ghrelin • Obestatin • NPY • High-carbohydrate breakfast

Corresponding author

Jara Nedvidkova, Institute of Endocrinology, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. Fax: +420 224 905 325. E-mail: jnedvidkova@endo.cz

Introduction

Anorexia nervosa (AN) and bulimia nervosa (BN) are psychiatric and somatic diseases, occurring mainly in young women, characterized by abnormal eating behaviour and an imbalance in energy homeostasis. Peptides of gut-brain axis play a pivotal role in the regulation of energy homeostasis. Neuropeptide Y (NPY), belonging to family of peptides synthesized in neural tissue of central (hypothalamus and stem brain) and peripheral nervous system, exerts diverse biological and pathological actions that bear on all major vital systems (Hillebrand *et al.* 2002). Recent studies have suggested that NPY is not merely an “orexigen”, but acts to stimulate behaviour which precedes the food intake and actually inhibits intake per se (Sederholm *et al.* 2002, Ammar *et al.* 2005). The treatment with NPY increased physical activity and decreased food intake and caused a loss of body weight in rats (Nergardh *et al.* 2007). This finding can be in line with clinical observation in AN patients who are physically hyperactive and eat only a little food in spite of having depleted body fat and pathologically up-regulated hypothalamic orexigenic peptides (Holtkamp *et al.* 2003, Nergardh *et al.* 2007).

One of the main orexigenic peptides ghrelin, discovered by Kojima *et al.* (1999), is synthesized mainly in the stomach and transmits changes in food intake to the central nervous system through ghrelin receptors, which are localized on NPY neurons in the brain and the most of peripheral tissues (Papotti *et al.* 2000). Ghrelin has been shown to stimulate appetite and is involved in the regulation of energy balance. Increased fasting plasma ghrelin levels have been reported in underweight AN patients in several studies (Nedvidkova *et al.* 2003, Troisi *et al.* 2005, Janas-Kozik *et al.* 2007, Dostalova and Haluzik 2009), while only small group of researchers found increased fasting plasma ghrelin levels also in BN patients with a normal body mass index (BMI) (Tanaka *et al.* 2002, Kojima *et al.* 2005).

The most of authors have reported normal baseline ghrelin levels in symptomatic bulimic subjects (Monteleone *et al.* 2005, Rouach *et al.* 2007, Monteleone *et al.* 2008). Recently, gut peptide obestatin identified by Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2005) was found to originate from post-translational processing of the preproghrelin peptide in a similar manner as ghrelin. It was observed that obestatin had a suppressive effect on food intake in mice when injected peripherally or into the brain ventricles (Zhang *et al.* 2005, Lagaud *et al.* 2007). The majority of subsequent studies, however, did not reproduce the anorexigenic property of obestatin that was initially reported (Gourcerol *et al.* 2007, Monteleone *et al.* 2008, Nakahara *et al.* 2008, Germain *et al.* 2009). In our previous study, we observed a decrease in obestatin and ghrelin in the circulation of healthy subjects following a high-carbohydrate breakfast (Sedlackova *et al.* 2008), an increase in fasting plasma ghrelin and obestatin levels in AN patients, and a decrease in fasting plasma ghrelin and obestatin levels in obese patients (Zamrazilova *et al.* 2008). Since it is generally believed that ghrelin exerts its orexigenic effect mainly by activation NPY neurons (Goto *et al.* 2006), and because changes in basal plasma ghrelin and obestatin have been found in patients with AN and BN, we believe that these hormones may be involved in the pathophysiology of these disorders. Thus, in the present study, we measured the fasting and postprandial responses of ghrelin, obestatin and NPY to a high-carbohydrate breakfast. We assessed the changes of plasma levels of these hormones during the postprandial period to find out more about their relationship to food intake in AN and BN patients. The control group used for comparison consisted of healthy women.

Material and Methods

Study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Institute of Endocrinology in Prague. Prior to the study each participant signed an informed consent form.

Study subjects

Eight AN women patients with restrictive and purgative type of anorexia nervosa (age: 25.4 ± 1.9 years; BMI: 15.8 ± 0.5 kg/m²), thirteen BN women patients (age: 22.0 ± 1.05 years; BMI: 20.1 ± 0.41 kg/m²) and eleven healthy women (age: 25.1 ± 1.16 years; BMI: 20.9 ± 0.40 kg/m²) were recruited for this study. All subjects included in the study were nonsmokers, had no allergies and had been free of medications for at least two weeks prior the study. AN and BN patients were diagnosed according to the 4th edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 1994. All AN and BN patients were clinically stable and in relatively good health, except for their eating disorder and amenorrhea in AN patients and/or irregular cycle in BN patients. In AN patients group were included 5 patients with restrictive type and 3 patients with purgative type of AN. In BN patients group the average frequency of binge-purging episodes was 2.8x per day. Average duration of eating disorder was counted for all patients. In AN patients, the average duration of disorder was 6 years and 10 months, in BN patients 5 years and 6 months. All patients were investigated after 1 week of hospitalization at the Department of Psychiatry at Charles University, Prague. Healthy volunteers (C) had no history of cardiovascular disease, eating disorders or other psychiatric disease, had normal electrocardiogram (ECG), blood count, liver and renal function. All healthy women had regular menstrual cycle and were in follicular phase of the cycle.

Blood tests conducted before initiation of the study confirmed normal values for blood count, fasting blood glucose, liver and renal function. Participants were recommended to avoid vigorous physical activity during the 14-hour period before blood samplings. All subjects consumed a standardized dinner at 6.00 PM and were then asked to fast overnight. Reported duration of sleep in the night preceding blood sampling was comparable in all studied subjects. All participants were admitted to the Institute of Endocrinology at 7.30 AM. Overall, the study lasted about 3.5 hours and the protocol consisted of high-

carbohydrate breakfast consumption and blood withdrawals. Body composition was measured using method of bioimpedance (Tanita, Japan) together with other physical examination before the beginning of the test.

Study design

Each subject received a high-carbohydrate breakfast with a total energy content of 1604 kJ, consisting of 81.9 g carbohydrates, 8.8 g proteins and 3.4 g fats in the form of a white bread roll (90 g) and strawberry jam (50 g). In addition, the subjects consumed 250 ml of fruit tea without sugar or other sweetener with the meal. Participants were given 15 minutes to consume their meal. Blood samples were drawn from the cubital vein using an intravenous cannula, the first blood drawn was collected before meal, and then 30, 60, 90, 120 and 150 min after breakfast consumption. Blood samples were collected into chilled polypropylene tubes containing Na₂EDTA and antilysin. Plasma was immediately separated by 15-min centrifugation at 5 °C and stored at -70 °C until being assayed.

Analytical measurements

Plasma obestatin immunoreactivity was measured by a commercial RIA kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, U.S.A.), the intra- and interassay variability was 5.0 % and 14.2 %, respectively, sensitivity was 50 pg/ml. Total plasma ghrelin and NPY were determined by commercially available RIA kits (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, U.S.A.). The intra- and interassay variability for total ghrelin was 6.4 % and 16.3 %, sensitivity was 93 pg/ml, for NPY the intra- and interassay variability was 5.0 % and 8.4 % respectively, sensitivity was 3 pmol/l.

Statistical analysis

The dependence of hormone levels on patient's status and stage of the meal test was evaluated using repeated measures ANOVA model consisting of subject factor, between-subject factor "patient's status", within-subject factor "stage of the meal test" and interaction "patient's status" × "stage of the meal test". Least significant difference multiple comparisons followed the ANOVA testing. The level of statistical significance $P < 0.05$ was chosen for both ANOVA and multiple comparisons. Due to non-Gaussian data distribution in all dependent variables these underwent power transformations to attain distributional symmetry and a constant variance both in the data and residuals.

The relationships between NPY, and patient's status, ghrelin and obestatin levels were evaluated using multivariate regression (the method of orthogonal projections to latent structures), which was robust to multicollinearity. Gaussian distribution and occurrence of non-homogeneities persisting in the data after power transformation were checked using normal probability plot and Hotelling's statistic, respectively.

The statistical software Statgraphics Centurion v. XV from Statpoint, Inc. (Herndon, Virginia, USA) and SIMCA v. 12.0 from Umetrics (Umeå, Sweden) were used for data analysis.

Results

The fasting plasma ghrelin, obestatin and NPY levels, and their postprandial responses to high-carbohydrate breakfast in C, AN and BN patients, as well as the ghrelin/obestatin ratio are summarized in Figure 1. Basic anthropometric and biochemical parameters for all groups are summarized in Table 1.

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters (AN, BN, C).

Variable	AN (n=8)	BN (n=13)	C (n=11)
Age (years)	25.4±1.9	22.0±1.05	25.1±1.16
BMI (kg/m ²)	15.8±0.5*	20.1±0.41	20.9±0.40
Lean body mass (%)	87.5±1.2*	74.2±2.3	69.9±2.7
Fat mass (%)	11.9±1.4*	25.3±1.3	29.2±1.6
IGF-I (ng/ml)	253.42±33*	395.77±54	455.76±41
IGF BP-III (ng/ml)	2832.54±138*	3286.17±241	3478.56±112

Data are expressed as mean ± SEM. Index * means significant differences between AN, BN and C ($p < 0.05$).

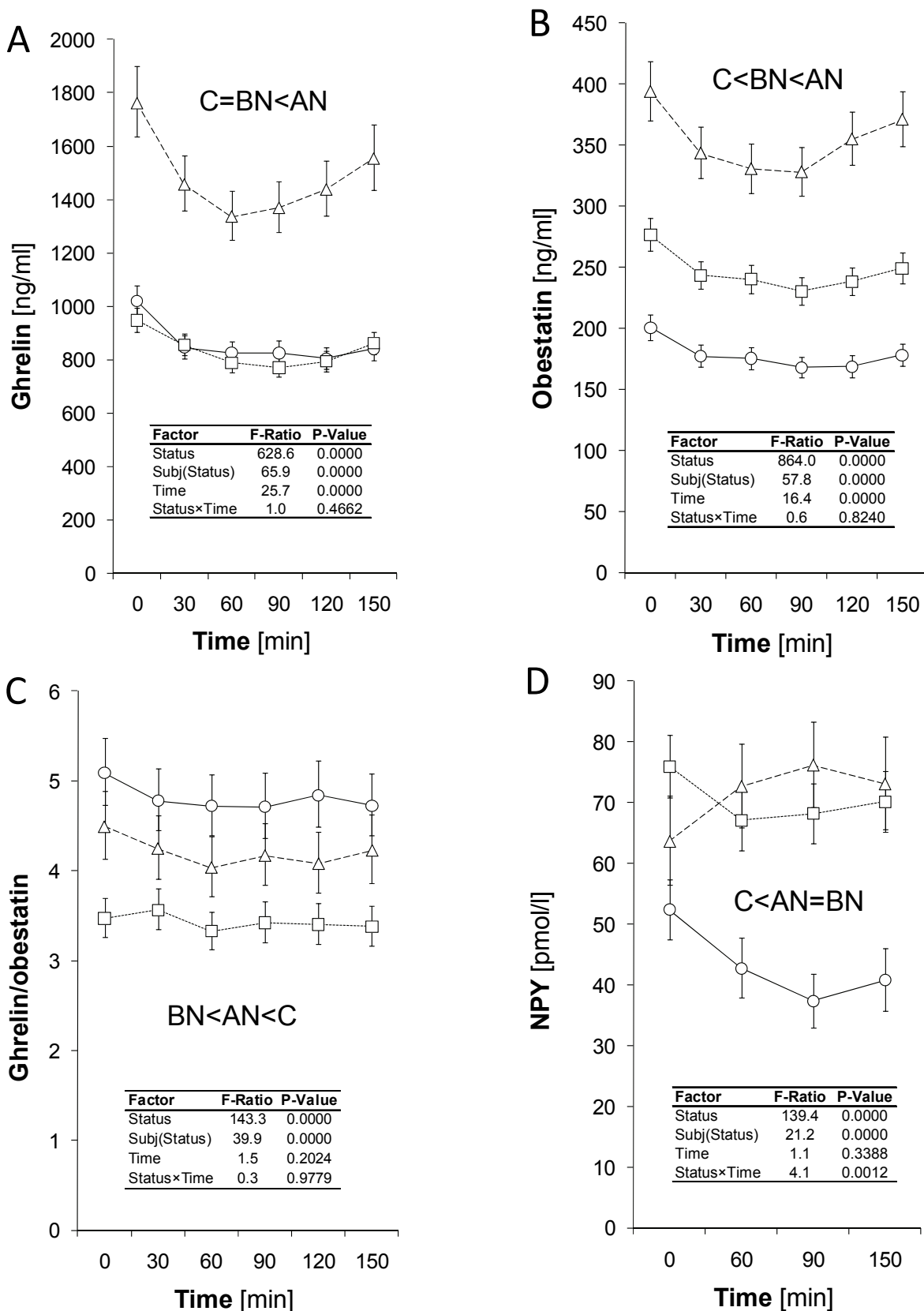


Fig. 1. Serum levels of NPY, ghrelin, obestatin and ghrelin/obestatin ratio during the meal test. The circles, triangles and squares with error bars represent the retransformed means with their 95 % confidence intervals for the controls (C), patients suffering with anorexia nervosa (AN), and patients suffering with bulimia nervosa (BN), respectively as evaluated by repeated measures ANOVA followed by least significant difference multiple comparisons. For the details see Statistical data analysis. The character "<" in the smaller embedded table means "significantly lower than" as found using least significant difference multiple comparisons for the levels of the factor "Status".

Table 2. Dependence of NPY on ghrelin, obestatin and on the anorexia and bulimia status as evaluated using multivariate regression (orthogonal projection to latent stuctures).

Variables		Parameter	95 % Confidence interval of the parameter	Parameter/ 95 % CI	Significance of the parameters	Correlation with the common predictive component
<i>NPY</i>	<i>Dependent variable</i>	1.000	0.289	3.47	p<0.01	0.506
<i>Anorexia</i>	<i>Predictors</i>	0.391	0.037	10.66	p<0.01	0.574
<i>Bulimia</i>		0.272	0.099	2.76	p<0.01	0.400
<i>Controls</i>		-0.626	0.085	-7.34	p<0.01	-0.919
<i>Ghrelin</i>		0.318	0.089	3.56	p<0.01	0.467
<i>Obestatin</i>		0.553	0.089	6.22	p<0.01	0.812
<i>Time</i>		-0.065	0.120	-0.54	NS	-0.095
<i>R</i> ^{2 a)}				25.6 %		
<i>Q</i> ^{2 b)}				23.9 %		

^{a)} R^2 is the percent of variation of dependent variable explained by the model. ^{b)} Q^2 is the percent of variation of dependent variable predicted by the model according to cross validation.

The fasting plasma ghrelin levels were significantly increased in AN patients as documented by significance factor “patient’s status” and significant multiple comparisons AN vs. C and AN vs. BN (Fig. 1A). The effect of breakfast was also significant showing U-shaped dependence regardless of the patient’s status, reaching lowest level in 60th minute as clearly documented by significant factor “stage of the meal test”, by insignificant interaction “patient’s status” × “stage of the meal test” and by multiple comparisons for individual stages of the test.

As documented by insignificant interaction “patient’s status” × “stage of the meal test” and by multiple comparisons for individual stages of the test, plasma obestatin levels postprandially showed a similar trend to ghrelin, with the minimum in the 90th minute. Obestatin levels were significantly higher in AN as compared to BN, and levels in BN were significantly higher than in C, as shown from significant factor “patient’s status” and from multiple comparisons for individual groups (Fig. 1B).

The fasting ghrelin/obestatin ratio was lower in AN patients than in C and the ratio in BN was significantly lower than that for AN. These results are obvious from Figure 1C showing significant factor “patient’s status” and

significant differences when using multiple comparisons for individual groups. The effect of the meal test was insignificant for the ghrelin/obestatin ratio.

NPY exhibited no differences between AN and BN but both groups showed higher levels when compared with C. As documented by significant interaction “patient’s status” × “stage of the meal test” as well as by multiple comparisons the effect of the meal test differed from group to group. While AN showed insignificant decrease and BN insignificantly increasing trend, C expectedly significantly decreased up to the 60th min.

The relationships between NPY, ghrelin and obestatin were analyzed using multivariate regression. As demonstrated in Table 2, NPY was positively associated with BN and AN, and negatively with C. This means that NPY levels are higher in AN and BN than in C. NPY was strongly positively correlated with obestatin and less strongly but still significantly with ghrelin. Using the regression model, NPY levels were independent of the stage of the meal test. The last finding is in contradiction with the results of ANOVA test, evidently due to absence of interaction “patient’s status” × “stage of the meal test” in the regression model.

Patients with AN had significantly lower fat mass (%) and significantly higher lean body mass (LBM,

%) comparing to other two groups. The BMI was counted for every group, AN patients had significantly lower BMI comparing to BN patients and the controls. BN patients had significantly higher BMI compared with AN patients and similar to the controls.

Discussion

The most important finding of the present study is that fasting NPY was increased in AN and BN patients and did not change after a high-carbohydrate breakfast, in spite of the decreased ghrelin and obestatin levels, in underweight AN and in BN patients compared with healthy women. Further, in contrast to AN patients, BN patients had increased fasting obestatin, but not fasting ghrelin levels. The ghrelin to obestatin ratio was lower in both patient groups compared with the control group.

In our previous study, we documented that the standard breakfast-induced suppression of increased plasma ghrelin in AN patients was almost completely absent (Nedvidkova *et al.* 2003). The type of nutrients and total calories provided in breakfast may influence the ghrelin response to food intake as we observed in the study with a high-fat meal (Nedvidkova *et al.* 2003), similarly as with other authors (Erdmann *et al.* 2004, Nakai *et al.* 2004, Otto *et al.* 2005). The duration of total anorectic status and the variation in the clinical characteristics of patient samples, has been suggested to explain these discrepancies. For example, Tanaka *et al.* (2003) observed a decrease of increased fasting plasma ghrelin levels to oral glucose administration in dependence on AN type, with the decrease evident in the restrictive type of AN and a normal but delayed response in AN patients with habitual binge-purge behaviour. The initially claimed anorexigenic role of obestatin in mice (Zhang *et al.* 2005, Guo *et al.* 2008, Monteleone *et al.* 2008) was highly negated by a number of authors who recently reported that they have been unable to reproduce these initial findings (Samson *et al.* 2007, Monteleone *et al.* 2008, Germain *et al.* 2009). In previous study we observed a similar decrease of plasma ghrelin and obestatin in healthy subjects following a high-carbohydrate breakfast (Sedlackova *et al.* 2008). The present and other studies indicate that both fasting plasma ghrelin and obestatin concentrations are increased in AN patients compared with the controls (Harada *et al.* 2008, Monteleone *et al.* 2008, Nakahara *et al.* 2008, Germain *et al.* 2009), but we observed the ghrelin/obestatin ratio to be decreased in the postprandial period in these patients. These results indicate that obestatin secretion is higher than

ghrelin secretion in AN individuals compared with the controls. This could have different effects on food intake.

In comparison with underweight AN patients we observed normal fasting ghrelin levels in BN patients, also documented by other researchers (Nakazato *et al.* 2004, Monteleone *et al.* 2005, Troisi *et al.* 2005). These authors suppose that it is unlikely that ghrelin plays a role in the pathophysiology of BN (Monteleone *et al.* 2005, Troisi *et al.* 2005). On the other hand, Tanaka *et al.* (Tanaka *et al.* 2002) demonstrated that mean plasma ghrelin levels in BN patients were significantly higher than in the controls, though mean BMI between the groups were not significantly different. These findings may lead to presumption that an abnormal eating behaviour with habitual binge eating and purging of different intensity may have a different influence on gastric secretion and circulating ghrelin levels in BN. The increased fasting plasma obestatin but not ghrelin levels in BN patients could be explained by action of these two peptides on different levels in eating behaviour regulations. Further research in physiology and pathophysiology of obestatin is needed for clarifying these findings. It may be supposed that regulation of energy homeostasis could depend upon the ratio between ghrelin and obestatin peptides. We documented a decrease of the ghrelin to obestatin ratio in both AN and BN patients. However, we did not confirm the higher ghrelin to obestatin ratio in AN patients observed by Monteleone *et al.* (2008). Monteleone *et al.* believe that a higher prevalence of binge-purging in the AN patients in their group may have been the cause of this discrepancy (Monteleone *et al.* 2008). Our results support previous observations of Germain *et al.* (2009) who described decreased acylated ghrelin to obestatin and total ghrelin to obestatin ratios in AN patients as compared with constitutionally thin and the control subjects. We may speculate that increased expression of the preproghrelin gene likely does not occur in a one to one ratio for ghrelin and obestatin and may be one of causes of the lower ghrelin to obestatin ratio in our AN and BN patients.

To date no study has reported the increase of fasting NPY and mostly absent response to a high-carbohydrate breakfast in both AN and BN patients compared with healthy women. Currently we cannot confidently explain these findings. Recently, a novel peripheral site for NPY biosynthesis was found in adipocytes where NPY stimulates proliferation of primary preadipocytes (Kos *et al.* 2007, Yang *et al.* 2008) and in this manner participates on adipogenesis. We may

speculate that by this manner NPY leads to increased functioning of the defensive system of the organism before exhaustion of energy reserves. However, the possibility that higher NPY biosynthesis in the adipose tissue may occur or rather its higher brain secretion leads to its increased plasma levels in AN and BN patients is difficult to interpret and needs to be clarified by further studies.

The increased plasma ghrelin stimulates NPY synthesis in the brain, which in turn stimulates food intake (Gil-Campos *et al.* 2006). However, we found increased plasma NPY levels and decreased plasma ghrelin levels during the postprandial period in AN patients. Thus, we did not demonstrate that feedback between ghrelin and NPY in AN patients exists. In BN patients with normal BMI levels, we found increased basal NPY. Increased response of NPY to exercise compared with the controls was also observed in our previous study (unpublished results). This may indicate that basal plasma NPY levels are not directly related to lower BMI, but rather to eating disorder itself.

On the basis of the strongly positive correlation between NPY and obestatin and the weaker, but still significant, correlation with ghrelin, we suppose that obestatin might influence the appetite differently from the ghrelin molecule. The increase of both fasting ghrelin and obestatin levels in AN but only plasma obestatin in BN demonstrates that obestatin might use other pathways to

modulate appetite than ghrelin does. Higher fasting NPY levels with antilipolytic properties and almost absent response to high-carbohydrate breakfast in both patient groups might indicate protection of the organism before energetic exhaustion.

In conclusion, we assume that increased fasting NPY levels unchanged after a high-carbohydrate breakfast indicates that NPY may be an important marker for disturbed eating behaviour in AN and BN. The distinct fasting ghrelin and obestatin levels together with simultaneously increased NPY levels in AN and BN patients may document different pathways or efficiency of obestatin and ghrelin to modulate the appetite and eating behaviour. Further studies are needed to elucidate, if changes in plasma hormone levels in patients with AN and BN are the cause or rather the consequence of eating disorders.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the grant No. NR/ 9158-3 provided by the Grant Agency IGA Ministry of Health, Czech Republic. We would like to thank Ms. Diana Riegerová, Naděžda Procházková, Jana Novotná and Romana Bajtlová for their technical assistance.

References

- AMMAR AA, NERGÅRDH R, FREDHOLM BB, BRODIN U, SÖDERSTEN P: Intake inhibition by NPY and CCK-8: A challenge of the notion of NPY as an "Orexigen". *Behav Brain Res* **161**: 82-87, 2005.
- DOSTALOVA I, HALUZIK M: The role of ghrelin in the regulation of food intake in patients with obesity and anorexia nervosa. *Physiol Res* **58**: 159-170, 2009.
- ERDAMN J, TÖPSCHR, LIPPL F, GUSSMANN P, SCHUDZIARRA V: Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin and glucose. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 3048-3054, 2004.
- GERMAIN N, GALUSCA B, GROUSELLE D, FRERE D, TOLLE V, ZIZZARI P, LANG F, EPELBAUM J, ESTOUR B: Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* **34**: 413-419, 2009.
- GIL-CAMPOS M, AGUILERA CM, CAÑETE R, GIL A: Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br J Nutr* **96**: 201-226, 2006.
- GOTO M, ARIMA H, WATANABE M, HAYASHI M, BANNO R, SATO I, NAGASAKI H, OISO Y: Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *Endocrinology* **147**: 5102-5109, 2006.
- GOURCEROL G, COSKUN T, CRAFT LS, MAYER JP, HEIMAN ML, WANG L, MILLION M, ST-PIERRE DH, TACHÉ Y: Preproghrelin-derived peptide, obestatin, fails to influence food intake in lean or obese rodents. *Obesity* **15**: 2643-2652, 2007.

- GUO ZF, REN AJ, ZHENG X, QIN YW, CHENG F, ZHANG J, WU H, YUAN WJ, ZOU L: Different responses of circulating ghrelin, obestatin levels to fasting, re-feeding and different food compositions, and their local expressions in rats. *Peptides* **29**: 1247-1254, 2008.
- HARADA T, NAKAHARA T, YASUHARA D, KOJIMA S, SAGIYAMA K, AMITANI H, LAVIANO A, NARUO T, INUI A: Obestatin, acyl ghrelin, and des-acyl ghrelin responses to an oral glucose tolerance test in the restricting type of anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* **63**: 245-247, 2008.
- HILLEBRAND JJ, DE WIED D, ADAN RA: Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* **23**: 2283-2306, 2002.
- HOLTKAMP K, HERPERTZ-DAHLMANN B, MIKA C, HEER M, HEUSSEN N, FICHTER M, HERPERTZ S, SENF W, BLUM WF, SCHWEIGER U, WARNKE A, BALLAUFF A, REMSCHMIDT H, HEBEBRAND J: Elevated physical activity and low leptin levels co-occur in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 5169-5174, 2003.
- JANAS-KOZIK M, KRUPKA-MATUSZCZYK I, MALINOWSKA-KOŁODZIEJ I, LEWIN-KOWALIK J: Total ghrelin plasma level in patients with the restrictive type of anorexia nervosa. *Regul Pept* **140**: 43-46, 2007.
- KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, NAKAZATO M, MATSUO H, KANGAWA K: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656-660, 1999.
- KOJIMA S, NAKAHARA T, NAGAI N, MURANAGA T, TANAKA M, YASUHARA D, MASUDA A, DATE Y, UENO H, NAKAZATO M, NARUO T: Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clin Endocrinol* **62**: 74-78, 2005.
- KOS K, HARTE AL, JAMES S, SNEAD DR, O'HARE JP, McTERNAN PG, KUMAR S: Secretion of neuropeptide Y in human adipose tissue and its role in maintenance of adipose tissue mass *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**: E1335-E1340, 2007.
- LAGAUD GJ, YOUNG A, ACENA A, MORTON MF, BARRETT TD, SHANKLEY NP: Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* **357**: 264-269, 2007.
- MONTELEONE P, FABRAZZO M, TORTORELLA A, MARTIADIS V, SERRITELLA C, MAJ M: Circulating ghrelin is decreased in non-obese and obese women with binge eating disorder as well as in obese non-binge eating women, but not in patients with bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* **30**: 243-250, 2005.
- MONTELEONE P, SERRITELLA C, MARTIADIS V, SCOGNAMIGLIO P, MAJ M: Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 4418-4421, 2008.
- NAKAHARA T, HARADA T, YASUHARA D, SHIMADA N, AMITANI H, SAKOGUCHI T, KAMIJI MM, ASAKAWA A, INUI A: Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* **64**: 252-255, 2008.
- NAKAI Y, HOSODA H, NIN K, Ooya C, HAYASHI H, AKAMIZU T, KANGAWA K: Short-term secretory regulation of the active form of ghrelin and total ghrelin during an oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* **150**: 913-914, 2004.
- NAKAZATO M, HASHIMOTO K, SHIINA A, KOIZUMI H, MITSUMOTI M, IMAI M, SHIMIZU E, IYO M: No changes in serum ghrelin levels in female patients with bulimia nervosa. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**: 1181-1184, 2004.
- NEDVIDKOVA J, KRYKORKOVA I, BARTAK V, PAPEZOVA H, GOLD PW, ALESCI S, PACAK K: Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 1678-1682, 2003.
- NERGARDH R, AMMAR A, BRODIN U, BERGSTRÖM J, SCHEURINK A, SÖDERSTEN P: Neuropeptide Y facilitates activity-based-anorexia. *Psychoneuroendocrinology* **32**: 493-502, 2007.
- OTTO B, TSCHÖP, FRÜHAUF, HELDWEIN W, FICHTER M, OTTO C, CUNTZ U: Postprandial ghrelin release in anorectic patients before and after weight gain. *Psychoneuroendocrinology* **30**: 577-581, 2005.
- PAPOTTI M, GHE C, CASSONI P, CATAPANO F, DEGHENGI R, GHIGO E, MUCCIOLI G: Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 3803-3807, 2000.

- ROUACH V, BLOCH M, ROSENBERG N, GILAD S, LIMOR R, STERN N, GREENMAN Y: The acute ghrelin response to a psychological stress challenge does not predict the post-stress urge to eat. *Psychoneuroendocrinology* **32**: 693-702, 2007.
- SAMSON WK, WHITE MM, PRICE C, FERGUSON AV: Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**: R637-R643, 2007.
- SEDERHOLM F, AMMAR AA, SÖDERSTEN P: Intake inhibition by NPY: role of appetitive ingestive behaviour and aversion. *Physiol Behav* **75**: 567-575, 2002.
- SEDLACKOVA D, DOSTALOVA I, HAINER V, BERANOVÁ L, KVASNICKOVA H, HILL M, HALUZIK M, NEDVIDKOVA J: Simultaneous decrease of plasma obestatin and ghrelin levels after a high-carbohydrate breakfast in healthy women. *Physiol Res* **57** (Suppl 1): S29-S37, 2008.
- TANAKA M, NAKAHARA T, MURANAGA T, KOJIMA S, YASUHARA D, UENO H, NAKAZATO M, INUI A: Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* **146**: R1-R3, 2002.
- TANAKA M, TATEBE Y, NAKAHARA T, YASUHARA D, SAGIYAMA K, MURANAGA T, UENO H, NAKAZATO M, NOZOE S, NARUO T: Eating pattern and the effect of oral glucose on ghrelin and insulin secretion in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol* **59**: 574-579, 2003.
- TROISI A, DI LORENZO G, LEGA I, TESAURO M, BERTOLI A, LEO R, IANTORNO M, PECCHIOI C, RIZZA S, TURRIZIANI M, LAURO R, SIRACUSANO A: Plasma ghrelin in anorexia, bulimia, and binge-eating disorder: relations with eating patterns and circulating concentrations of cortisol and thyroid hormones. *Neuroendocrinology* **81**: 259-266, 2005.
- YANG K, GUAN H, ARANY E, HILL DJ, CAO X: Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *Faseb J* **22**: 2452-2464, 2008.
- ZAMRAZILOVA H, HAINER V, SEDLACKOVA D, PAPEZOVA H, KUNESOVA M, BELLISLE F, HILL M, NEDVIDKOVA J: Plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women. *Physiol Res* **57** (Suppl 1): S49-S55, 2008.
- ZHANG JV, REN PG, AVSIAN-KRETCHMER O, LUO CW, RAUCH R, KLEIN C, HSUEH AJ: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* **310**: 996-999, 2005.

Comparison of a high-carbohydrate and high-protein breakfast effect on plasma ghrelin, obestatin, NPY and PYY levels in women with anorexia and bulimia nervosa

Dana Sedlackova^{1,3,4}
Email: dana.sedlackova@centrum.cz

Jana Kopeckova¹
Email: jana.kopeckova@email.cz

Hana Papezova^{2,5}
Email: hpap@seznam.cz

Vojtech Hainer¹
Email: vhainer@endo.cz

Hana Kvasnickova¹
Email: hkvasnickova@endo.cz

Martin Hill¹
Email: mhill@endo.cz

Jara Nedvidkova^{1*}
* Corresponding author
Email: jnedvidkova@endo.cz

¹ Institute of Endocrinology, Narodni 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic

² First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

³ Department of Anthropology and Human Genetics, Charles University, Prague, Czech Republic

⁴ Faculty of Science, Department of Anthropology and Human Genetics, Charles University, Vinicna 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic

⁵ First Faculty of Medicine, Psychiatric Department, Ke Karlovu 11, 120 00, Prague 2, Czech Republic

Abstract

Background

The present study investigated plasma levels of gut-brain axis peptides ghrelin, obestatin, NPY and PYY after consumption of a high-carbohydrate (HC) and high-protein (HP) breakfast in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa and in healthy controls. These peptides play an important role in regulation of energy homeostasis and their secretion is disturbed under condition of eating disorders. As various types of consumed macronutrients may induce different plasma hormone responses, we examined these responses in women patients with eating disorders and compared them with those of healthy controls.

Methods

We examined plasma hormone responses to HC and HP breakfast in patients with AN (n = 14; age: 24.6 ± 1.8 years, BMI: 15.3 ± 0.7), BN (n = 15; age: 23.2 ± 1.7 years, BMI: 20.5 ± 0.9) and healthy controls (n = 14; age: 24.9 ± 1.4 years, BMI: 21.1 ± 0.8). Blood samples were drawn from the cubital vein, the first blood drawn was collected before meal, and then 30, 60, 90, 120 and 150 min after breakfast consumption. Plasma hormone levels were determined by commercially available RIA kits.

Results

Fasting and postprandial plasma obestatin levels were significantly increased in both AN and BN patients, while plasma ghrelin levels were significantly increased in AN patients only. After breakfast consumption, plasma levels of ghrelin and obestatin decreased, although they were still above the range of values of healthy controls. Fasting NPY plasma levels were significantly increased in AN and BN patients and did not change postprandially. Fasting PYY levels were comparable in AN, BN and healthy controls, but postprandially significantly increased after HP breakfast in AN and BN patients. Different reactions to breakfast consumption was found for ghrelin and PYY among investigated groups, while for obestatin and NPY these reactions were similar in all groups.

Conclusions

Significant increase of obestatin and NPY in AN and BN patients may indicate their important role as the markers of eating disorders. Different reactions of ghrelin and PYY to breakfast consumption among groups suggest that role of these hormones in regulation of energy homeostasis can be adjusted in dependence to acute status of eating disorder.

Keywords

Ghrelin, Obestatin, NPY, PYY, Anorexia nervosa, Bulimia nervosa, high-carbohydrate breakfast, high-protein breakfast

Background

Food intake and appetite are controlled by hypothalamus, where nucleus arcuatus (ARC) through interaction of peripheral hormonal and metabolic signals control all processes relating to energy balance. Peptides of gut-brain axis play a pivotal role in regulation of energy homeostasis and their secretion is disturbed under condition of eating disorders, including anorexia nervosa (AN) and bulimia nervosa (BN). These psychiatric and somatic diseases are characterized by abnormal eating behaviour and imbalance in energy homeostasis. Neuropeptide Y (NPY) has a number of important functions in regulation of appetite and energy homeostasis [1]. NPY neurons in the hypothalamic ARC play a central role in stimulation of feeding, they sense and integrate peripheral and central signals, including ghrelin and leptin [2]. Ghrelin is a peptide produced mainly by stomach, which as appetite-stimulating hormone transmits changes in food intake to the central nervous system [3]. The effect of ghrelin is related to the antagonism of the inhibitory effect of leptin on hypothalamic NPY production [4-6]. A novel peptide hormone obestatin, derived from the same gene as ghrelin, has been initially postulated to antagonize ghrelin actions on energy homeostasis and gastrointestinal functions [7-9], however the most of subsequent studies could not confirm its reported anorexigenic effects [10-13]. Plasma levels of these hormones, both fasting and postprandial, were investigated in AN and BN patients. Most of previous studies reported increased fasting plasma ghrelin levels in AN patients [3,14-17] and recent studies also presented increased fasting plasma obestatin levels in these patients [17,18]. In BN patients were reported either no changes in fasting ghrelin or increased plasma ghrelin levels, compared to healthy controls [15,19,20]. Monteleone et al. (2008) did not find any increase in fasting obestatin plasma levels in BN patients [17]. However, in our previous study, we found increased fasting plasma ghrelin levels only in AN patients while obestatin levels were elevated in both group of patients with AN and BN [21]. Peptide YY (PYY) is a member of the pancreatic polypeptide family, which has been reported to reduce food intake [22]. It is suggested that peripheral PYY acts as a satiety signal regulating the termination of individual meals, partially by decreasing the production of the hunger-stimulating peptide ghrelin [17]. Fasting PYY levels have been reported to be low in healthy people [23,24], normal [25] or increased [26-28] in AN patients and normal in BN patients [20,23]. Leptin is a peptide hormone, secreted mainly by adipose tissue, which influences long-term energy homeostasis. Decreased leptin levels were measured in AN patients with undernutrition [19,29].

All introduced hormones are involved in regulation of food intake and energy homeostasis, either in acute (ghrelin, obestatin, PYY) or long-term changes (leptin, NPY). The effect of specific macronutrients (carbohydrates, proteins, fat) on secretion of above mentioned hormones has been partially investigated in humans. However, results reported in individual studies are very different, especially in studies aimed to patients with eating disorders. Prince et al. compared the results of studies concerned to gut hormone levels in patients with eating disorders, with general conclusion that these patients had higher baseline concentrations of ghrelin and PYY. No differences were found in release of these hormones to a standardized test meal, when compared to healthy controls [30].

To our knowledge, no study has measured simultaneously pre- and postprandial secretion of ghrelin, obestatin, NPY, PYY and leptin in patients with AN and BN. Therefore the aim of present study was to investigate plasma levels of these hormones after consumption of two meals with different content of macronutrients (high-protein and high-carbohydrate breakfast) in patients with AN, BN and healthy women. We investigated if plasma hormone

responses are different after consumption of high-protein and high-carbohydrate breakfast within the observed groups. Simultaneously, we compared if plasma hormone responses to the same HC/HP breakfast differs among patients with AN, BN and healthy controls.

Methods

Subjects

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by Ethic Committee of Institute of Endocrinology in Prague. All participants undersigned informed consent prior to the study. Fourteen patients with AN, both restrictive and purgative type (age: 24.6 ± 1.8 years, BMI: 15.3 ± 0.7), fifteen women with BN (age: 23.2 ± 1.7 years, BMI: 20.5 ± 0.9) and fourteen healthy controls (age: 24.9 ± 1.4 years, BMI: 21.1 ± 0.8 kg/m²) were enrolled in the study. Healthy controls (C) were recruited from university students, age-matched to AN and BN patients. They had no history of eating disorders, had normal electrocardiogram (ECG), blood count, liver and renal functions. Blood tests and physical examination were conducted before the test. All healthy women had regular menstrual cycle and were in follicular phase of the cycle at the time of study. AN and BN patients were diagnosed according to the 4th edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 1994. All AN and BN patients were clinically stable and in relatively good health, except for their eating disorder and amenorrhea. All patients were investigated after 1 week of hospitalization at the Department of Psychiatry at Charles University, Prague. Blood tests conducted before initiation of the study confirmed normal values for blood count, fasting blood glucose, liver and renal functions.

Participants were recommended to avoid vigorous physical activity during the 14-hour period before blood samplings. All subjects consumed a standardized dinner at 6.00 PM and were then asked to fast overnight. Reported duration of sleep in the night preceding blood sampling was comparable in all studied groups. All participants were admitted to the Institute of Endocrinology at 7.30 AM. The study lasted about 3.5 hours and the protocol consisted of high-carbohydrate breakfast consumption and blood withdrawals [21]. One week later, all patients were investigated again and they received high-protein breakfast with the same study protocol. Body composition was measured using method of bioimpedance [Tanita, Japan] together with other physical examination before the beginning of both breakfasts.

Study design

Each participant received a high-carbohydrate breakfast (HC) with a total energy content of 1604 kJ, consisting of 81.9 g carbohydrates, 8.8 g proteins and 3.4 g fats in the form of a white bread roll (90 g) and strawberry jam (50 g) [21]. One week later, each participant received a high-protein breakfast (HP) with a total energy content of 1350 kJ, consisting of 41.3 g proteins, 16.3 g carbohydrates and 8.1 g fat in the form of a cottage cheese (150 g), chicken ham (75 g) and wheat store-bread (15 g). In addition, the subjects consumed 250 ml of fruit tea without sugar or other sweetener together with the meal. Participants had 15 minutes time-limit to consume their meal. Blood samples were drawn from the cubital vein using an intravenous cannula, the first blood drawn was collected before meal, and then 30, 60, 90, 120 and 150 min after breakfast consumption. Blood samples were collected into chilled polypropylene tubes containing Na₂EDTA and antilysin. Plasma was immediately separated by 15-min centrifugation at 5°C and stored at -70°C until being assayed [21].

Analytical measurements

Total plasma ghrelin and NPY were determined by commercially available RIA kits (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, U.S.A.). The intra- and interassay for total ghrelin was 6.4% and 16.3%, sensitivity was 93 pg/mL, for NPY the intra- and interassay was 5.0% and 8.4% respectively, sensitivity was 3 pmol/L. Plasma obestatin was measured by a commercial RIA kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, U.S.A.), the intra- and interassay variability was 5.0% and 14.2%, respectively, sensitivity was 50 pg/mL. Plasma PYY was determined by commercially available RIA kit (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, U.S.A.). The intra- and interassay for total PYY was 5.8% and 13.9%, sensitivity was 72 pg/mL.

Statistical data analysis

The dependence of metric variables on factors was evaluated using repeated measures ANOVA model consisting of subject factor, repeated and non-repeated factors and interaction between factors. Least significant difference multiple comparisons followed the ANOVA testing. The level of statistical significance $P < 0.05$ was chosen for both ANOVA and multiple comparisons. Due to non-Gaussian data distribution in all dependent variables these underwent power transformations to attain distributional symmetry and a constant variance both in the data and residuals. Data transformation and analysis of variance was performed using Statgraphics Centurion version XV software (Statpoint Inc, Herndon, Virginia, USA). The relationships between variables were evaluated using multivariate regression after transformation of variables to symmetry and constant variance. The statistical software SIMCA v. 12.0 from Umetrics (Umeå, Sweden) was used for data analysis.

Results

The fasting plasma levels of ghrelin, obestatin, NPY and PYY and their postprandial responses after high-carbohydrate (HC) and high-protein (HP) breakfast consumption are presented in Figures 1, 2, 3 and 4 for all investigated groups.

Figure 1 Plasma levels of ghrelin during the meal test. The circles, triangles and squares with error bars represent the retransformed means with their 95% confidence intervals for controls (C), patients suffering with anorexia nervosa (AN), and patients suffering with bulimia nervosa (BN), respectively as evaluated by repeated measures ANOVA followed by least significant difference multiple comparisons. For the details see Statistical data analysis. High-carbohydrate breakfast is marked by empty symbol (○, △, □), high-protein breakfast is marked by full symbol (●, ▲, ■)

Figure 2 Plasma levels of obestatin during the meal test. The circles, triangles and squares with error bars represent the retransformed means with their 95% confidence intervals for controls (C), patients suffering with anorexia nervosa (AN), and patients suffering with bulimia nervosa (BN), respectively as evaluated by repeated measures ANOVA followed by least significant difference multiple comparisons. For the details see Statistical data analysis. High-carbohydrate breakfast is marked by empty symbol (○, △, □), high-protein breakfast is marked by full symbol (●, ▲, ■)

Figure 3 Plasma levels of NPY during the meal test. The circles, triangles and squares with error bars represent the retransformed means with their 95% confidence intervals for controls (C), patients suffering with anorexia nervosa (AN), and patients suffering with bulimia nervosa (BN), respectively as evaluated by repeated measures ANOVA followed by least significant difference multiple comparisons. For the details see Statistical data analysis. High-carbohydrate breakfast is marked by empty symbol (○, △, □), high-protein breakfast is marked by full symbol (●, ▲, ■)

Figure 4 Plasma levels of PYY during the meal test. The circles, triangles and squares with error bars represent the retransformed means with their 95% confidence intervals for controls (C), patients suffering with anorexia nervosa (AN), and patients suffering with bulimia nervosa (BN), respectively as evaluated by repeated measures ANOVA followed by least significant difference multiple comparisons. For the details see Statistical data analysis. High-carbohydrate breakfast is marked by empty symbol (○, △, □), high-protein breakfast is marked by full symbol (●, ▲, ■)

Ghrelin

Fasting and postprandial plasma ghrelin levels were significantly increased in AN patients compared to the controls and BN patients. After both types of breakfast, plasma ghrelin levels significantly decreased, with minimum at 90 min after HC breakfast and 30 min after HP breakfast. Factor “breakfast” was not significant in AN patients, but interaction “breakfast” x “time (stage of the meal test)” showed different course of ghrelin in time after HC and HP breakfast. In BN patients, fasting and postprandial levels of ghrelin were comparable to values of healthy controls. After both types of breakfast, plasma ghrelin levels decreased, however this decrease was significant only after HC breakfast. Minimum ghrelin values were reached 90 min after HC breakfast and 30 min after HP breakfast (equally, as in AN patients). The course of ghrelin after both types of breakfast was different after HC and HP breakfast in BN patients. In healthy control women, plasma ghrelin levels significantly decreased after both types of breakfast with minimum at 120 min after HC breakfast and 60 min after HP breakfast. The factor “breakfast” was significant. As documented by significant interaction “status” x “breakfast” in overall ANOVA, the ghrelin reaction was different after HC and HP breakfast consumption among investigated groups.

Obestatin

Fasting plasma obestatin levels were found significantly increased in both AN and BN patients compared to the controls. The highest basal values were observed in AN patients, similarly as plasma ghrelin values. In these patients plasma obestatin levels decreased significantly after both types of breakfast, with minimum at 90 min after HC and 30 min after HP breakfast. Neither factor “breakfast” nor interaction “breakfast” x “time” were significant in AN patients, and therefore no difference was found in ghrelin reaction in time after HC and HP breakfast consumption. In BN patients, plasma obestatin levels decreased significantly after both types of breakfast, with minimum values at 90 min after HC breakfast and 150 min after HP breakfast. As documented by significant factor “breakfast” and interaction “breakfast” x “time”, course of obestatin after both types of breakfast was different in BN patients. In healthy control group, plasma obestatin levels also significantly decreased after both HC and HP breakfast consumption and course of obestatin was different in time. The obestatin reaction after HC and HP breakfast was similar in all groups, although

plasma levels had different range of values, as documented by interaction “status” x “breakfast” in overall ANOVA.

NPY

Fasting and postprandial plasma levels of NPY were significantly increased in AN and BN patients compared to the controls. No changes were found postprandially in AN patients after both types of breakfast, but in BN patients and healthy controls plasma NPY decreased after HC breakfast. After HP breakfast consumption no significant changes were found. However, as indicated by interaction “breakfast” x “time”, the course of NPY after HC and HP breakfast consumption was not significantly different in all investigated groups. Also no differences were found in NPY reaction to breakfasts consumption among investigated groups.

PYY

Fasting plasma levels of PYY were found in similar range of values for all investigated groups. However, significant differences were found in postprandial responses of PYY to HC and HP breakfast in patients with AN and BN compared to the controls. In AN and BN groups, plasma PYY levels reached significantly higher values after HP breakfast compared to HC breakfast, with maximum in 120 min for AN and 90 min for BN. In healthy control group, postprandial increase was also observed after HP breakfast, however this increase was not significant and reached values were significantly lower than plasma PYY levels in AN and BN groups. As documented by significant interaction “status” x “breakfast” in overall ANOVA, the PYY course after HC and HP breakfast was different among investigated groups.

Leptin

Basal plasma levels of leptin were found significantly lower in AN and BN patients compared to healthy women. We found no changes in leptin levels postprandially either after HC or HP breakfast consumption in all investigated groups.

Correlations

Status of anorexia nervosa was found to be positively correlated with plasma levels of ghrelin, obestatin, NPY and PYY and negatively correlated with BMI, percent of body fat and weight. Status of bulimia nervosa was found to be positively correlated with plasma levels of NPY, obestatin and PYY, and negatively with leptin levels.

Discussion

This study was designed to investigate the plasma responses of ghrelin, obestatin, NPY and PYY after high-carbohydrate and high-protein breakfast consumption in AN and BN patients and in healthy women. We found fasting plasma obestatin levels significantly increased in AN and BN patients, while ghrelin levels were increased only in AN patients. Postprandially, we observed significant decrease in plasma ghrelin levels after both types of breakfast in all investigated groups. Different plasma response of ghrelin to HC and HP breakfast was observed in all investigated groups. Regarding obestatin levels, they also decreased

postprandially after both types of breakfast in all investigated groups. In BN patients and healthy controls the reaction of obestatin was different to HC and HP breakfast, however in AN patients no difference was found.

Our results for fasting ghrelin and obestatin levels in AN patients and healthy controls are consistent with present findings of other authors. Recent studies showed increased plasma obestatin and ghrelin levels in AN patients [18,26,31]. Monteleone et al. (2008) found increased fasting plasma obestatin levels in AN patients, however in BN patients obestatin levels were comparable to healthy controls [17]. In our previous study, we demonstrated for the first time that plasma obestatin levels significantly decrease after consumption of a high-carbohydrate breakfast in a similar way as ghrelin levels in healthy women [32]. Results of present study correspond with our previous findings and were confirmed also for AN and BN patients, independently on the type of consumed breakfast. This positive relationship of obestatin and ghrelin in postprandial period indicates that these two cleavage products of preproghrelin act in a similar way to increase food intake. Comparison of hormone responses to HC and HP breakfast confirmed mostly different reaction of these hormones in time to the type of macronutrient. During comparison of groups, similar reactions to food intake were confirmed for obestatin in AN patients, BN patients and healthy women, however the values of plasma obestatin were different. Contrary, ghrelin responses to food intake were different among groups.

NPY plays a central role in stimulation of feeding and regulation of energy homeostasis. We found fasting plasma levels of NPY significantly higher in AN and BN patients, when compared to the healthy controls. This finding is partially in accordance with studies of other authors, where NPY levels were reported to be both increased [33,34] and decreased [35] in AN patients. Plasma NPY levels in our study showed no difference in time to HC or HP breakfast in all groups. Overall analysis for all groups showed that reaction of plasma NPY to HC and HP breakfast consumption was not significantly different among groups. To date, no study has reported any response of NPY to carbohydrate and protein meal in healthy controls or AN and BN patients, therefore we have no possibility to compare our findings. Production of leptin correlates positively with adipose tissue mass and circulating leptin levels, and thus reflects energy stores of organism. In our study fasting plasma leptin levels were significantly lower in AN and BN patients and no changes were found postprandially.

Circulating PYY levels are low in the fasting state and rapidly increase postprandially when two forms, PYY1-36 and PYY3-36 are released to circulation. In our study we observed significant increase in postprandial plasma levels in AN and BN patients after HP breakfast, much higher than those in healthy controls. This suggests strong influence of macronutrient type to postprandial secretion of PYY in patients with eating disorders. These results partially correspond with study of Nakahara et al. (2007), where PYY3-36 plasma levels were increased after standard meal consumption in both AN patients and healthy controls [26]. Our results are also partly in accordance with review of Prince et al. (2009), where patients with eating disorders had higher baseline concentrations of PYY and ghrelin [30]. In contrast, in study of Stock et al. (2005) PYY increased significantly in the controls, but not in AN patients [36]. In BN patients, initial studies reported normal plasma levels of PYY. Recently, two independent research groups have reported a blunted PYY3-36 response to food ingestion in symptomatic BN women together with a decreased response of ghrelin [20,23]. Both studies have shown a negative correlation between meal-induced PYY increase and ghrelin decrease, confirming a negative interaction of PYY3-36 with ghrelin [17].

Correlations between status of eating disorder and investigated hormones were evaluated. As status of anorexia nervosa was found to be positively correlated with plasma levels of ghrelin, obestatin, NPY and PYY, we suppose that all these hormones are included in pathology of eating disorder and their levels are changed probably as a consequence of eating disorder. Status of bulimia nervosa was found to be positively correlated with plasma levels of NPY, obestatin and PYY and negatively with leptin levels, which suggest a lot of common with status of anorexia nervosa, at least regarding behavior of plasma hormones and disturbed regulation of energy homeostasis.

Conclusions

In conclusion, we demonstrated that significant differences exist in hormonal responses of ghrelin, obestatin and PYY to a high-carbohydrate and high-protein breakfast consumption within investigated groups. Increased fasting plasma levels of NPY and obestatin were confirmed in AN and BN groups, which suggest a role of these hormones as a markers for eating disorders. PYY levels reached much higher values after high-protein breakfast in AN and BN patients, indicating an important role of ingested macronutrient to plasma levels of this hormone. Different reactions of ghrelin and PYY to breakfast consumption were found among investigated groups.

Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Authors' contributions

DS carried out research, contributed on analytical measurements and wrote the article. JK participated on research and analytical measurements. HP selected and provided hospitalized patients with AN and BN suitable for the study. VH contributed in writing of the article. HK examined all participants prior to the study. MH performed statistical data analysis. JN designed research, led the grant project, contributed in writing of the article. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the grant NR/9158-3 provided by IGA Ministry of Health, Czech Republic, and by the project of Ministry of Health (Czech Republic) for conceptual development of research organization 00023761 (Institute of Endocrinology, Prague). We thank Diana Riegerova, Nada Prochazkova, Miloslava Jungmannova and Romana Bajtlova for their technical assistance.

References

1. Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Cao X (2008) Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J* 22(7):2452–2464

2. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S (2005) Appetite control. *J Endocrinol* 184(2):291–318
3. Otto B, Tschöp M, Frühauf E, Heldwein W, Fichter M, Otto C, Cuntz U (2005) Postprandial ghrelin release in anorectic patients before and after weight gain. *Psychoneuroendocrinology* 30:577–581
4. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50(2):227–232
5. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409(6817):194–198
6. Seoane LM, Al-Massadi O, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF (2004) Ghrelin: from a GH-secretagogue to the regulation of food intake, sleep and anxiety. *Pediatr Endocrinol Rev* 1(Suppl 3):432–437
7. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996–999
8. Tremblay F, Perreault M, Klamann LD, Tobin JF, Smith E, Gimeno RE (2007) Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology* 148(2):501–506
9. Carlini VP, Schiöth HB, Debarioglio SR (2007) Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 352(4):907–912
10. Gourcerol G, Million M, Adelson DW, Wang Y, Wang L, Rivier J, St-Pierre DH, Taché Y (2006) Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* 27(11):2811–2819
11. Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW (2007) GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 148(1):13–20
12. Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve D, Vázquez MJ, Wiedmer P, Castañeda TR, DiMarchi R, Tschöp M, Schurmann A, Joost HG, Williams LM, Langhans W, Diéguez C (2007) Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148(1):21–26
13. Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas EH, Toda K, Takahashi K, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y (2007) Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul Pept* 138(2–3):141–144

14. Nedvidkova J, Krykorkova I, Bartak V, Papezova H, Gold PW, Alesci S, Pacak K (2003) Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1678–1682
15. Troisi A, Di Lorenzo G, Lega I, Tesauro M, Bertoli A, Leo R, Iantorno M, Pecchioli C, Rizza S, Turriziani M, Lauro R, Siracusano A (2005) Plasma ghrelin in anorexia, bulimia, and binge-eating disorder: relations with eating patterns and circulating concentrations of cortisol and thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 81(4):259–266
16. Janas-Kozik M, Krupka-Matuszczyk I, Malinowska-Kolodziej I, Lewin-Kowalik J (2007) Total ghrelin plasma level in patients with the restrictive type of anorexia nervosa. *Regul Pept* 140(1–2):43–46
17. Monteleone P, Serritella C, Martiadis V, Scognamiglio P, Maj M (2008) Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4418–4421
18. Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frere D, Tolle V, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B (2009) Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: Constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 34:413–419
19. Tanaka M, Nakahara T, Kojima S, Nakano T, Muranaga T, Nagai N, Ueno H, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T (2004) Effect of nutritional rehabilitation on circulating ghrelin and growth hormone levels in patients with anorexia nervosa. *Regul Pept* 122(3):163–168
20. Kojima S, Nakahara T, Nagai N, Muranaga T, Tanaka M, Yasuhara D, Masuda A, Date Y, Ueno H, Nakazato M, Naruo T (2005) Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clin Endocrinol* 62:74–78
21. Sedlackova D, Kopeckova J, Papezova H, Vybiral S, Kvasnickova H, Hill M, Nedvidkova J. (2011) Changes of plasma obestatin, ghrelin and NPY in anorexia and bulimia nervosa patients before and after a high-carbohydrate breakfast. *Physiol Res.* 60(1):165-73.
22. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR (2002) Gut hormone PYY(3–36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418(6898):650–654
23. Monteleone P, Fabrazzo M, Tortorella A, Martiadis V, Serritella C, Maj M (2005) Circulating ghrelin is decreased in non-obese and obese women with binge eating disorder as well as in obese non-binge eating women, but not in patients with bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 30(3):243–250
24. Batterham RL, Bloom SR (2003) The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Ann N Y Acad Sci* 994:162–168
25. Stock S, Lechner P, Wong AC, Ghatei MA, Kieffer TJ, Bloom SR, Chanoine JP (2005) Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to

a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 90(4):2161–2168

26. Nakahara T, Kojima S, Tanaka M, Yasuhara D, Harada T, Sagiya K, Muranaga T, Nagai N, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T, Inui A (2007) Incomplete restoration of the secretion of ghrelin and PYY compared to insulin after food ingestion following weight gain in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res* 41(10):814–820

27. Misra M, Miller KK, Tsai P, Gallagher K, Lin A, Lee N, Herzog DB, Klibanski A (2006) Elevated peptide YY levels in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 91(3):1027–1033

28. Pfluger PT, Kampe J, Castaneda TR, Vahl T, D'Alessio DA, Kruthaupt T, Benoit SC, Cuntz U, Rochlitz HJ, Moehlig M, Pfeiffer AF, Koebnick C, Weickert MO, Otto B, Spranger J, Tschöp MH (2007) Effect of human body weight changes on circulating levels of peptide YY and peptide YY3-36. *J Clin Endocrinol Metab* 92(2):583–588

29. Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A (2005) Secretory dynamics of leptin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(3):E373–E381

30. Prince AC, Brooks SJ, Stahl D, Treasure J (2009) Systematic review and meta-analysis of the baseline concentrations and physiologic responses of gut hormones to food in eating disorders. *Am J Clin Nutr* 89(3):755–765

31. Harada T, Nakahara T, Yasuhara D, Kojima S, Sagiya K, Amitani H, Laviano A, Naruo T, Inui A (2008) Obestatin, acyl ghrelin, and des-acyl ghrelin responses to an oral glucose tolerance test in the restricting type of anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 63:245–247

32. Sedlackova D, Dostalova I, Hainer V, Beranova L, Kvasnickova H, Hill M, Haluzik M, Nedvidkova J (2008) Simultaneous decrease of plasma obestatin and ghrelin levels after a high-carbohydrate breakfast in healthy women. *Physiol Res* 57(Suppl 1):S29–S37

33. Escobar L, Freire JM, Espinosa R, Pajares M, Girón JA, Vázquez JM, Chover A, Carrasco M, Ortero J, Gavilán I, Segura E, Aguilar M (2002) Determination of insulin, leptin and neuropeptide Y by radioimmunoanalysis in patients with morbid obesity and anorexia nervosa after therapeutic intervention. *Rev Esp Med Nucl*. 21(1):3-11

34. Oświecimska J, Ziora K, Geisler G et al (2005) Prospective evaluation of leptin and neuropeptide Y (NPY) serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett* 26:301–304

35. Baranowska B, Wolinska-Witort E, Wasilewska-Dziubinska E, Roguski K, Chmielowska M (2001) Plasma leptin, neuropeptide Y (NPY) and galanin concentrations in bulimia nervosa and in anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett* 22(5):356–358

36. Stock S, Lechner P, Wong AC, Ghatei MA, Kieffer TJ, Bloom SR, Chanoine JP (2005) Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 90(4):2161

Figure 1. Plasma levels of ghrelin during the meal test

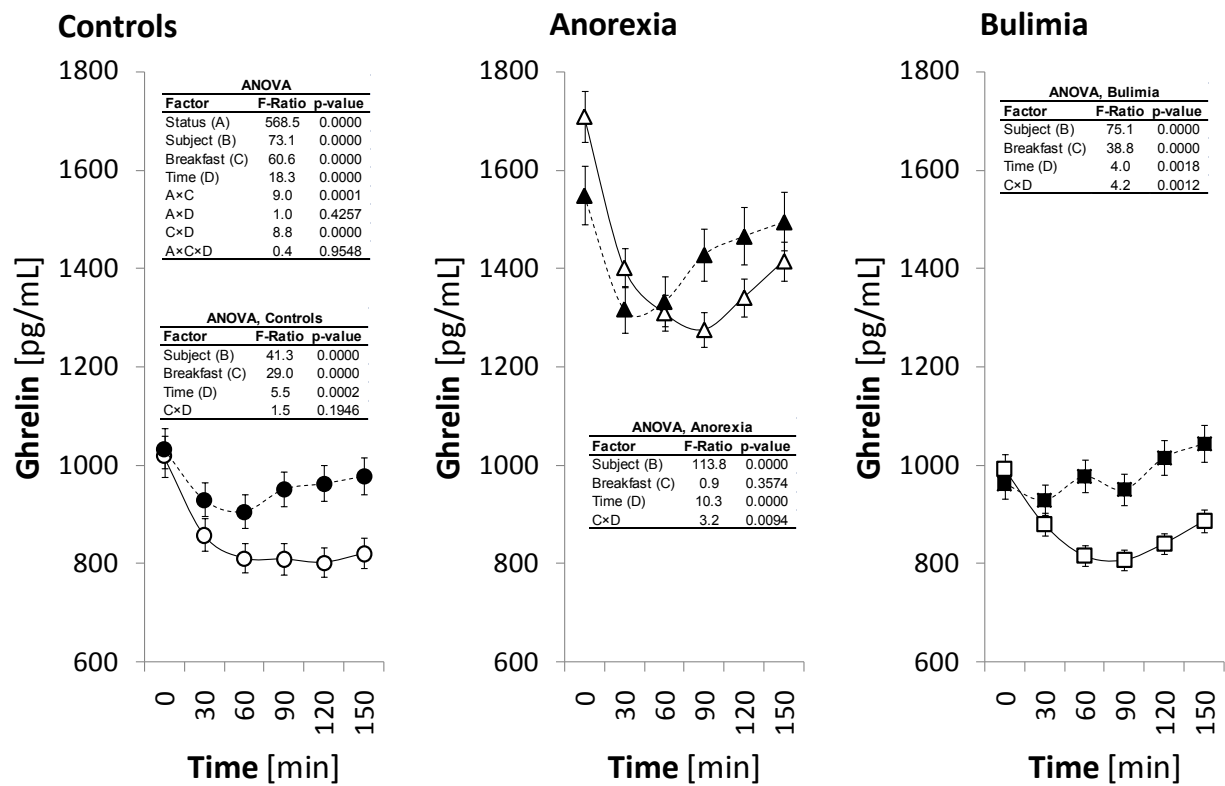


Figure 2. Plasma levels of obestatin during the meal test

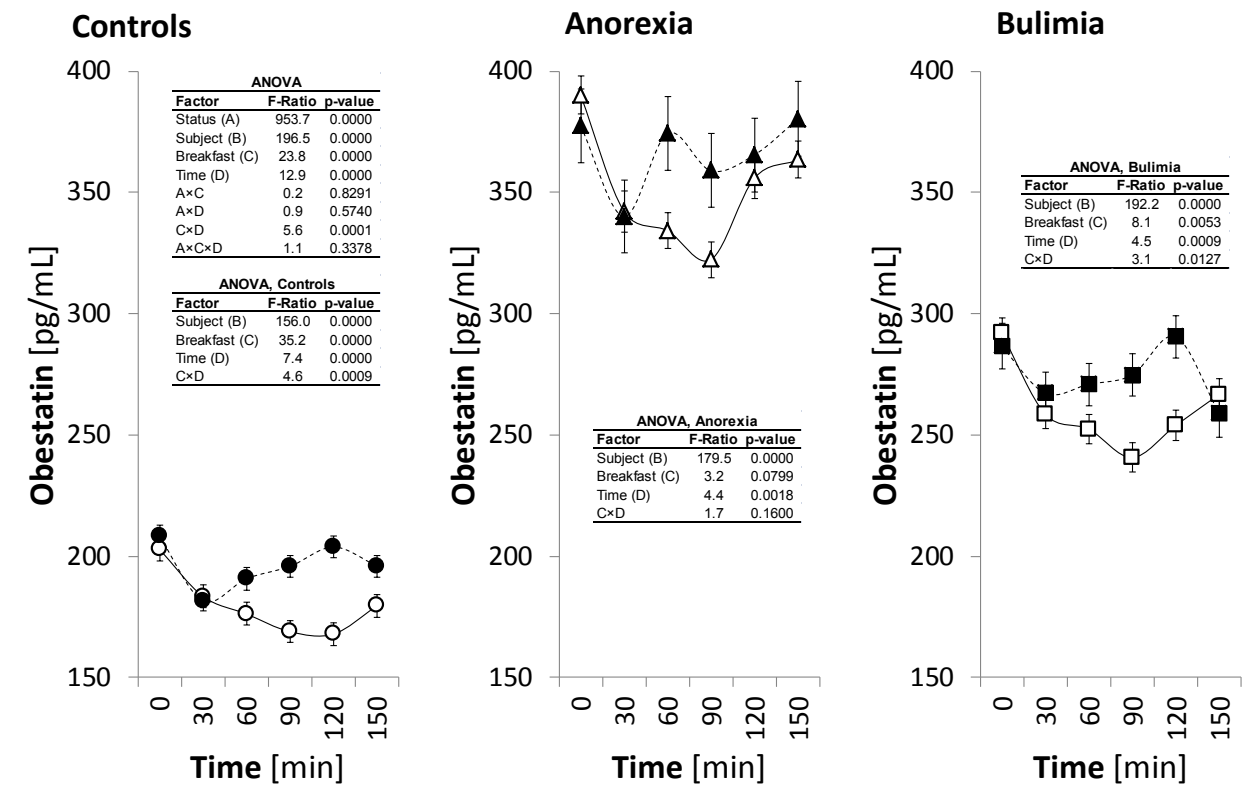


Figure 3. Plasma levels of NPY during the meal test

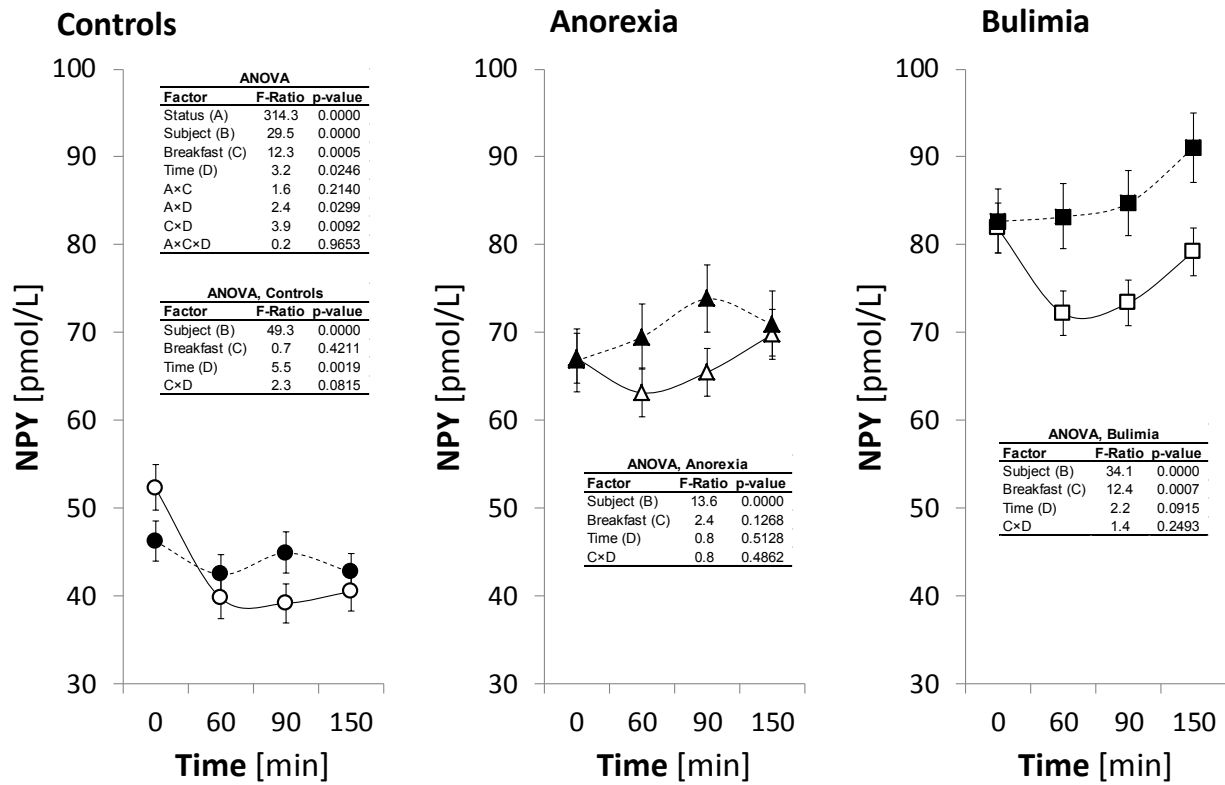
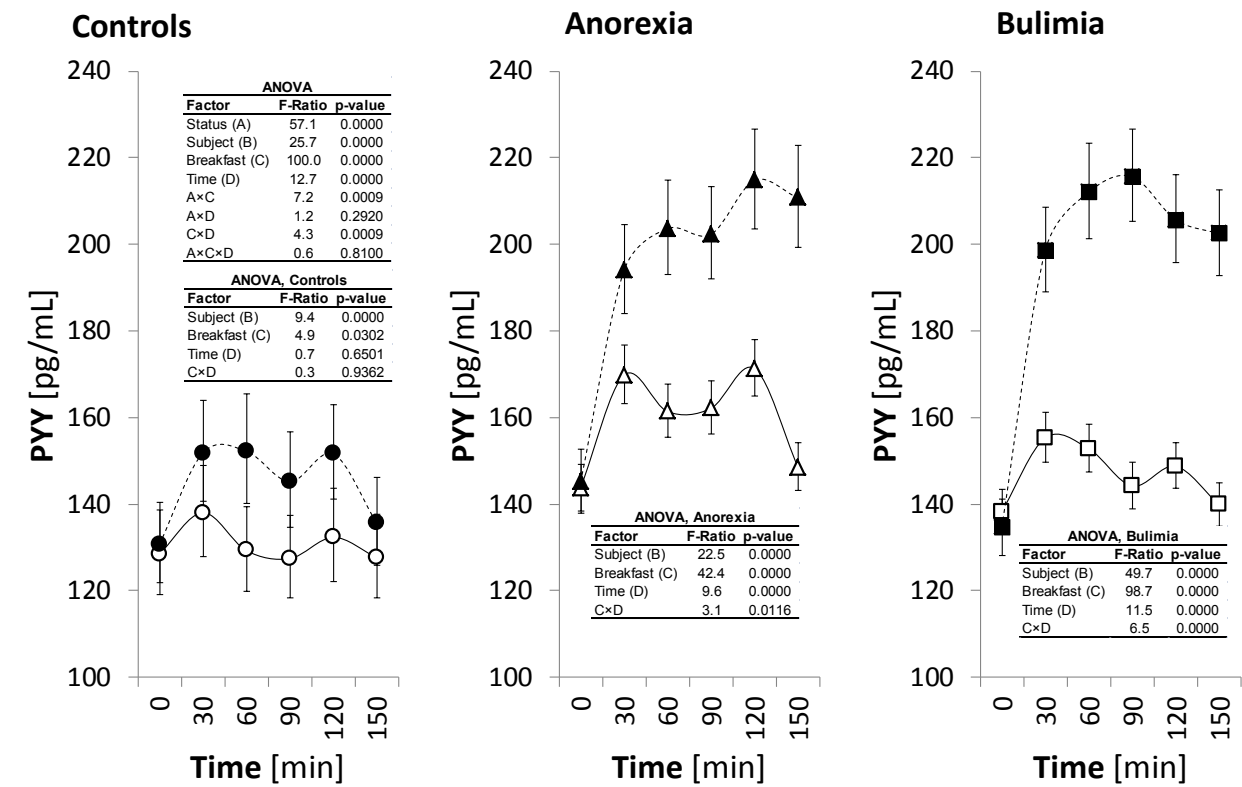


Figure 4. Plasma levels of PYY during the meal test



Plazmatické hladiny neuropeptidu Y, ghrelinu a leptinu u pacientek s anorexia nervosa a jejich změny po šestitýdenní realimentaci

L. Beranová¹, D. Sedláčková¹, J. Kopečková¹, V. Hainer¹, H. Papežová², H. Kvasničková¹, J. Nedvídková¹

¹ Laboratoř klinické a experimentální neuroendokrinologie Endokrinologického ústavu Praha, vedoucí pracoviště RNDr. Jara Nedvídková, CSc.

² Oddělení poruch příjmu potravy Psychiatrické kliniky 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha, vedoucí pracoviště prof. MUDr. Hana Papežová, CSc.

Souhrn: Úvod: Anorexia nervosa je charakterizována výraznými změnami v sekreci hormonů ovlivňujících příjem potravy, energetickou homeostázu a dlouhodobou regulaci tělesné hmotnosti. Cílem této studie bylo stanovit u pacientek s anorexia nervosa plazmatické hladiny neuropeptidu Y, ghrelinu a leptinu a změny těchto hormonů po 6týdenní částečné nutriční realimentaci, která probíhala během hospitalizace. **Pacienti a metodika:** Do studie bylo zařazeno 10 žen s anorexia nervosa restriktivního typu (body mass index $14,74 \pm 0,43$; věk $23,3 \pm 1,0$), diagnostikovaných podle DSM-IV a v době studie hospitalizovaných na jednotce specializované pro poruchy příjmu potravy, a 10 zdravých kontrolních žen (body mass index $21,45 \pm 0,72$; věk $24,3 \pm 0,8$). Bazální plazmatické hladiny neuropeptidu Y, ghrelinu a leptinu byly měřeny na počátku a konci léčby. **Výsledky:** U pacientek s anorexia nervosa byly zjištěny významně zvýšené bazální plazmatické hladiny neuropeptidu Y a ghrelinu ve srovnání s kontrolními ženami, hladiny leptinu měly tyto pacientky významně nižší. Po 6 týdnech léčby hladiny ghrelinu u pacientek s anorexia nervosa významně poklesly a hladiny leptinu se zvýšily. Plazmatické hladiny neuropeptidu Y se během léčby nezměnily, průměrný body mass index u pacientek s anorexia nervosa významně vzrostl. **Závěr:** Plazmatické hladiny ghrelinu a leptinu se u pacientek s anorexia nervosa měnily očekávaným směrem podle změny tělesné hmotnosti. Plazmatické hladiny neuropeptidu Y nevykázaly v tomto směru významnou změnu. Hladiny leptinu tak spolu s dlouhodobě zvýšenými hladinami neuropeptidu Y ukazují na přetrvávající dysregulaci mechanismů řídících tělesnou hmotnost a apetit.

Klíčová slova: anorexia nervosa – neuropeptid Y – ghrelin – leptin – krátkodobá realimentace

Neuropeptide Y, ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and their changes during six-week refeeding

Summary: *Objective:* Anorexia nervosa (AN) is characterized by markedly changes in hormone secretion influencing food intake, energy homeostasis and long-term body weight regulation. The aim of this study was to determine neuropeptide Y (NPY), ghrelin and leptin plasma levels and their changes after six weeks of nutritional-rehabilitation program in severely malnourished anorexia nervosa patients. *Methods:* Ten women with DSM-IV diagnosed anorexia nervosa, hospitalized (BMI 14.74 ± 0.43 ; age 23.3 ± 1.0) and ten age-matched healthy women (BMI 21.45 ± 0.72 ; age 24.3 ± 0.8) were enrolled to the study. Fasting plasma levels of NPY, ghrelin and leptin were measured before and after the treatment. *Results:* Fasting plasma ghrelin and NPY levels were significantly increased in AN patients comparing to healthy women, while plasma leptin was decreased. After six weeks of the treatment plasma ghrelin levels significantly decreased and plasma leptin levels increased. Plasma NPY levels didn't change during the treatment, average BMI significantly increased in AN patients. *Conclusions:* We confirmed that ghrelin and leptin plasma levels express actual nutritional status of a body and did change during the six-weeks refeeding in AN patients. Plasma leptin levels together with constantly increased NPY levels indicate to persisting dysregulation of appetite and body weight control mechanisms in AN patients.

Key words: anorexia nervosa – neuropeptide Y – ghrelin – leptin – short-term refeeding

Úvod

V posledních letech u nás stále dochází nárůstu incidence a prevalence poruch příjmu potravy. Nejzávažnějším onemocněním je anorexia nervosa (AN), která je charakterizována výraznými, psychicky podmíněnými abnormalitami v příjmu potravy. Intenzivní obavy z nárůstu tělesné hmotnosti a zkreslené vnímání vlastního těla vede nemocné k závažnému omezení příjmu kalorií a úmyslnému hladovění, a to i v pří-

padě, že hmotnost je zcela přiměřená nebo pod hranicí normy [13]. Komplikacemi dlouhodobé podvýživy, zejména restriktivní formy AN, jsou poruchy endokrinních a imunitních funkcí, plicní, renální a gastrointestinální komplikace, poškození myokardu a osteoporóza [12]. U pacientů s AN dochází k výrazným změnám v sekreci hormonů, které ovlivňují příjem potravy, energetickou homeostázu a dlouhodobou regulaci tělesné hmotnosti [31].

Hlavním mozkovým centrem pro řízení příjmu potravy a udržení energetické homeostázy organismu je hypothalamus [12]. Mezi významné orexigenní hormony hypothalamu patří neuropeptid Y (NPY). Přibližně 40 % NPY je tvořeno v nucleus arcuatus (ARC) [9], menší množství uvolňují i další hypothalamická jádra a některé periferní tkáně mimo oblast mozku [32]. Podle nedávných nálezů secernují NPY v malém množství také buňky abdominální tukové tkáně [32].

Studie prováděné dosud u pacientek s AN uvádějí různé bazální plazmatické hladiny NPY. V některých studiích byly u těchto pacientek nalezeny hladiny NPY zvýšené oproti zdravým kontrolním ženám [5,20], jiní autoři naopak poukazují na snížené bazální hladiny NPY u AN [1]. Vyšší bazální hladiny NPY u pacientek s AN mohou být vysvětlovány potlačením vnímavosti homeostatického systému těchto pacientek k orexigennímu vlivu NPY. V současné době je známo málo o periferních účincích NPY. U zdravých jedinců NPY uvolňovaný centrální nervovou soustavou (CNS) navozuje pocit hladu a současně podporuje diferenciaci preadipocytů v tukové tkáni, které následně také produkují v malém množství NPY. Nadbytečný příjem potravy tak vede ke zvyšování tukové rezervy a počtu adipocytů [11]. Těmto nálezům odpovídají i dřívější pozorování zvýšených plazmatických hladin NPY u obézních osob [2].

Ghrelín je orexigenní hormon produkováný majoritně v žaludku. Zvyšuje příjem potravy a snižuje výdej energie a spolu s dalšími signály tak informuje centrum energetické rovnováhy o tom, kdy je nutné zásoby energie doplnit [16]. V hypothalamu ghrelín působí na centra v ARC tím, že se váže na receptory neuronů, obsahujících NPY a agouti-related peptide (AgRP), které ovlivňují chuť k jídlu a příjem potravy. Neurony v ARC jsou cílovou tkání i pro leptin, a to zejména proopiomelanocortinové (POMC-CART) a NPY-AgRP neurony. Aktivace orexigenních AgRP-NPY jader zvyšuje chuť k jídlu a metabolismus, zatímco aktivace POMC-CART neuronů má opačný efekt [10]. Hladina ghreluinu v krvi vzrůstá během půstu a klesá přibližně během hodiny po přijetí potravy [12,19]. U pacientů s AN jsou plazmatické koncentrace ghreluinu v důsledku negativní energetické bilance a dlouhodobého hladovění významně vyšší než u zdravých jedinců [4,19,24,29].

Za jednoho z hlavních antagonistů ghreluinu je považován anorexigenní hormon leptin, který potlačuje příjem po-

travy tím, že převádí do mozku signály, týkající se energetických zásob organismu [10,15,18]. Leptin je produkován převážně tukovou tkání a účastní se dlouhodobé regulace tělesné hmotnosti, energetické bilance a regulace tělesné teploty [6,25,28]. Jeho množství je u pacientů s AN významně nižší než u zdravých jedinců, v přímém vztahu k redukovanému množství tělesného tuku [5,8,17,23,30].

U pacientek s AN dochází během realimentace ke zvýšení tělesné hmotnosti a spolu s tím ke změnám v hladinách hormonů ovlivňujících příjem potravy. Plazmatické hladiny ghreluinu se vracejí částečně nebo zcela na normální úroveň, v závislosti na délce a úspěšnosti léčby. Plazmatické hladiny leptinu se po realimentaci u pacientek s AN zvyšují v závislosti na váhovém příbytku [3,12,14,19,21]. Plazmatické hladiny NPY a jejich změny během léčby byly dosud jen velmi málo prozkoumány, a navíc je jen obtížně zjistitelný zdroj jeho sekrece.

Cílem studie bylo u sledované skupiny pacientek s AN restriktivního typu zjistit bazální plazmatické hladiny NPY, ghreluinu a leptinu a jejich změny po 6týdenní částečné realimentaci, která probíhala během hospitalizace.

Soubor nemocných a metodika

Sledovaný soubor tvořilo 10 žen s DSM-IV diagnostikovanou anorexia nervosa restriktivního typu (věk $23,3 \pm 1,0$; BMI $14,74 \pm 0,43$), hospitalizovaných na Psychiatrické klinice 1. LF UK a VFN, a 10 zdravých kontrolních žen (věk $24,3 \pm 0,8$; BMI $21,45 \pm 0,72$). V den odběru krve bylo provedeno základní lékařské vyšetření a změřena tělesná výška a hmotnost. Žádná z probandek netrpěla závažným akutním ani chronickým onemocněním. Zdravým ženám byla krev odebírána ve folikulární fázi menstruačního cyklu, pacientky s AN měly amenoreu. Pacientkám byla krev odebrána 2krát, poprvé na počátku hospitalizace a podruhé po 6týdenní léčbě. Realimentace a úprava jídelního režimu byla součástí komplex-

ního terapeutického programu podle terapeutických doporučení [22]. Pacientky po 1–2 týdnech adaptace dostávaly klasickou racionální dietu s bílkovinnými přísadami 3 000–4 000 kcal, která mohla být obohacena podle závažnosti malnutrice sippingem nutričních nápojů, po poradě s lékařem nutricionistou. Všechny zúčastněné probandky podepsaly před zahájením studie informovaný souhlas s účastí ve studii, schválené Etickou komisí Endokrinologického ústavu.

Krev byla odebírána ráno v 7.30 hod po celonočním půstu, z loketní žíly, do zkumavek s Na₂EDTA a aprotininem (pro získání plazmy a inhibici proteáz). Bezprostředně po odběru byla krev uložena do ledové tříště, stočena při 4 °C a získaná plazma byla zamrazena při –30 °C. Následně byly radioimunologickou metodou (RIA) pomocí komerčních kitů stanoveny bazální plazmatické hladiny NPY, ghreluinu a leptinu (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, USA).

Naměřené hodnoty pacientek s AN před léčbou byly statisticky porovnány s hodnotami po léčbě pomocí párového neparametrického Wilcoxonova testu a dále s hodnotami kontrolního souboru 10 zdravých žen za použití Kruskal-Wallisova testu následovaného Kruskal-Wallisovými Z-testy vícenásobného porovnávání. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry \pm SEM, hladina významnosti byla zvolena $p < 0,05$.

Výsledky

Porovnání sledovaných parametrů je uvedeno v tab. 1. Hladiny plazmatického ghreluinu byly u pacientek s AN před léčbou významně vyšší než u zdravých žen, hladiny leptinu a BMI měly pacientky významně snížené. Po 6týdenním léčebném období došlo u pacientek s AN ke snížení hladin ghreluinu, které však zůstaly stále vyšší ve srovnání se zdravými ženami. Plazmatické hladiny leptinu se po částečné realimentaci významně zvýšily, zůstaly však nižší než průměrné hodnoty zdravých

žen. Hladiny plazmatického NPY byly u pacientek s AN významně vyšší než u zdravých kontrol a po 6týdenní realimentaci nedošlo k významným změnám. Průměrná hodnota BMI se během léčby významně zvýšila.

Diskuze

V této studii jsme sledovali u pacientek s AN vybrané hormony související s řízením příjmu potravy a energetického metabolismu – orexigenní peptidy NPY a ghrelin a anorexigenní leptin. Našli jsme zvýšené bazální plazmatické hladiny NPY u pacientek s AN, což je v souladu s již publikovanými výsledky [5,20]. Ve studii Escobara et al po 16týdenním realimentačním období a váhovém příbytku pacientek s AN plazmatické hodnoty NPY poklesly [5]. V naší studii jsme po kratším 6týdenním realimentačním období nezaznamenali pokles plazmatického NPY, jeho průměrné hladiny zůstaly významně vyšší a u poloviny pacientek došlo dokonce k jeho mírnému zvýšení během léčby. Jedním z možných vysvětlení může být, že NPY má funkci dlouhodobého regulátoru příjmu potravy a jeho hladiny se mění až po déletrvajících změnách výživového stavu organismu. Poměr hladiny plazmatického ghreluinu, který stimuluje uvolnění NPY při hladu, k plazmatickému NPY však po relativně krátkodobé realimentaci našich pacientek poklesl z výrazně vyšší hodnoty na hodnoty blízké kontrolním osobám. Důvodem je významné snížení plazmatických hodnot ghreluinu během realimentace. V nedávné době Kos et al (2008) zjistili, že NPY je v určitém množství produkován také abdominální tukovou tkání, a může se tak účastnit zpětnovazebné signalizace o adipozitě, a dokonce být částečně odpovědný za omezení sekrece leptinu u pacientek s AN. Lze soudit, že plazmatické hladiny NPY u pacientek s AN zůstávají na vyšší hodnotě vzhledem k tomu, že regulační zásahy orexigenního ghreluinu a anorexigenního leptinu nejsou ještě na takové úrovni, aby zajistily energetickou bilanci odpovídající normě.

Tab. 1. Hormonální charakteristiky pacientek s AN před a po 6týdenní realimentaci a porovnání s kontrolní skupinou zdravých žen.

	Kontroly (n = 10)	AN 1 (n = 10)	AN 2 (n = 10)
věk (roky)	24,3 ± 0,8	23,3 ± 1,0	23,3 ± 1,0
BMI (kg/m ²)	21,45 ± 0,72	14,74 ± 0,43 ^{ab}	17,55 ± 0,39 ^{ab}
ghrelin (pg/ml)	980,84 ± 71	2201,38 ± 186 ^{ab}	1433,33 ± 227 ^{ab}
leptin (ng/ml)	9,01 ± 1,19	1,68 ± 0,35 ^{ab}	4,45 ± 0,92 ^{ab}
NPY (pmol/l)	49,79 ± 6,03	67,77 ± 7,03 ^b	75,72 ± 7,86 ^b

AN 1 – pacientky s anorexia nervosa před léčbou, AN 2 – pacientky s anorexia nervosa po 6týdenní léčbě, kontroly – kontrolní soubor zdravých žen
Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.

^ap < 0,05 AN 1 vs AN 2; ^bp < 0,05 AN 1, AN 2 vs kontroly.

Plazmatické hladiny ghreluinu byly u sledovaných pacientek s AN v důsledku negativní energetické bilance na počátku realimentačního období významně zvýšené. Po šesti týdnech léčby hladiny ghreluinu významně poklesly, stále však zůstaly vyšší než u zdravých žen. Tyto výsledky ukazují na částečné potlačení chronického hladování u pacientek s AN a jsou v souladu s dříve publikovanými pracemi [3,12,14,19,21]. Plazmatické hladiny leptinu u pacientek s AN jsou v souvislosti s nadměrným úbytkem tukové tkáně výrazně snížené, což se potvrdilo i u naší sledované skupiny. Po šesti týdnech léčby hladiny leptinu výrazně vzrostly, i když stále zůstaly nižší než hodnoty zdravých žen. Tyto výsledky korespondují se studiemi Haluzíka et al [7], Svobodové et al [26] a Tagamiho et al [27] a potvrzují úlohu leptinu jako citlivého výživového parametru [7,26,27]. Hodnoty BMI se během 6týdenní léčby významně zvýšily, nedosáhly však ještě minimální hodnoty udávané pro zdravé ženy. Tato skutečnost také odpovídá tomu, že jak plazmatický NPY a ghrelin, tak ani leptin nedosáhly po léčbě hodnot kontrolních žen.

Závěr

Ze získaných výsledků vyplývá, že sledované hormony reagují na nutriční stav organismu a mění se u pacientek s anorexia nervosa spolu s nárůstem tělesné hmotnosti. Během 6týdenního realimentačního období se u pacientek s AN

plazmatické hladiny ghreluinu a leptinu posouvaly směrem k hodnotám kontrolních žen. Plazmatická hladina NPY zůstala na vyšší hodnotě zřejmě vzhledem k tomu, že regulační zásahy ghreluinu a leptinu nebyly ještě na takové úrovni, aby zajistily energetickou bilanci odpovídající normě. Započatá diferenciace preadipocytů pravděpodobně stimulací NPY pokračovala a tomu odpovídala i jeho zvýšená hladina.

Poděkování

Tato studie vznikla za podpory grantu IGA NR/9158-3 a VZ 21620816. Děkujeme Miloslavě Jungmannové za spolupráci při odběrech pacientek, Dianě Riegerové a Nadě Procházkové za technickou podporu při analytických laboratorních stanoveních.

Literatura

1. Baranowska B, Wolinska-Witort E, Wasilewska-Dziubinska E et al. Plasma leptin, neuropeptide Y (NPY) and galanin concentrations in bulimia nervosa and in anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett* 2001; 22: 356–358.
2. Baranowska B, Wolinska-Witort E, Wasilewska-Dziubinska E et al. The role of neuropeptides in the disturbed control of appetite and hormone secretion in eating disorders. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24: 431–434.
3. Bronský J, Nedvídková J, Schmidtová J et al. Ghrelin, leptin, IGF-I, IGF BP-3 and their relationship in girls with mental anorexia before and after realimentation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39: S74.
4. Čáp J. Ghrelin and anorexia nervosa. *Vnitř Lék* 2002; 48: 919–920.
5. Escobar L, Freire JM, Espinosa R et al. Determination of insulin, leptin and neuropeptide Y by radioimmunoanalysis in patients with morbid obesity and anorexia

- nervosa after therapeutic intervention. *Rev Esp Med Nucl* 2002; 21: 3–11.
6. Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 2002; 60: S1–S14.
 7. Haluzík M, Papežová H, Nedvídková J et al. Serum leptin levels in patients with anorexia nervosa before and after partial refeeding, relationships to serum lipids and biochemical nutritional parameters. *Physiol Res* 1999; 48: 197–202.
 8. Haluzík M, Kábrt J, Nedvídková J et al. Serum leptin levels in female patients with protein-calorie malnutrition and its relation to biochemical indicators of nutritional status. *Vnitř Lék* 1999; 45: 202–205.
 9. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002; 23: 2283–2306.
 10. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Mol Interv* 2002; 2: 494–503.
 11. Kos K, Harte AL, James S et al. Secretion of neuropeptide Y (NPY) in human adipose tissue and its role in maintenance of adipose tissue mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E1335–E1340.
 12. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495–522.
 13. Krch FD. Poruchy příjmu potravy. Praha: Grada 2005.
 14. Kršek M, Rosická M, Haluzík M et al. The changes in serum leptin levels and their relationship to IGF-I, its binding proteins and leptin in women patients with anorexia nervosa. *Vnitř Lék* 2002; 48: 948–951.
 15. Kryrková I, Nedvídková J. Nedávno objevené hormony s účastí v energetické homeostázi. *Čas Lék Čes* 2003; 2: 80–83.
 16. van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML et al. Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 2004; 25: 426–457.
 17. Monteleone P, Di Lietto A, Tortorella A et al. Circulating leptin in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa or binge-eating disorder: relationship to body weight, eating patterns, psychopathology and endocrine changes. *Psychiatry Res* 2000; 94: 121–129.
 18. Nedvídková J, Papežová H, Haluzík M et al. Interaction between serum leptin levels and hypothalamo-hypophyseal-thyroid axis in patients with anorexia nervosa. *Endocr Res* 2000; 26: 219–230.
 19. Nedvídková J, Kryrková I, Barták V et al. Loss of meal-Induced Decrease in Plasma ghrelin Levels in Patients with Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1678–1682.
 20. Oświecimska J, Ziara K, Geisler G et al. Prospective evaluation of leptin and neuropeptide Y (NPY) serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26: 301–304.
 21. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E et al. Weight Gain decrease elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 669–673.
 22. Papežová H, Kocourková J, Koutek J. Poruchy příjmu potravy. In: Raboch J, Anders M, Praško J et al (eds). *Psychiatrie. Doporučené postupy psychiatrické péče II*. Praha: Infopharm 2006: 127–140.
 23. Pařízková J, Křížová J, Jiskra J et al. Leptin levels in female patients with restrictive and purgative types of anorexia nervosa. *Čas Lék Čes* 2003; 142: 289–291.
 24. St-Pierre DH, Wang L, Taché Y. Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance. *News Physiol Sci* 2003; 18: 242–246.
 25. Strader AD, Woods CS. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 2005; 128: 175–191.
 26. Svobodová J, Haluzík M, Papežová H et al. Vliv částečné realimentace na sérové koncentrace leptinu a klidový energetický výdej u pacientek s mentální anorexií. *Čas Lék Čes* 1999; 24: 748–752.
 27. Tagami T, Satoh N, Usui T et al. Adiponectin in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1833–1837.
 28. Teff KL, Elliott SS, Tschöp M et al. Dietary Fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2963–2972.
 29. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707–709.
 30. Weigle DS, Cummings DE, Newby PD et al. Roles of leptin and ghrelin in the loss of body weight caused by a low fat, high carbohydrate diet. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1577–1586.
 31. Wren AM, Seal JL, Cohen MA et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992–5995.
 32. Yang K, Guan H, Arany E et al. Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J* 2008; 22: 2452–2464.

RNDr. Jara Nedvídková, CSc.
www.endo.cz
e-mail: jnedvidkova@endo.cz

Doručeno do redakce: 26. 11. 2008
Přijato po recenzi: 15. 3. 2009

PŮVODNÍ PRÁCE

Změny plazmatických hladin obestatinu a ghrelinu po podání rozpustné vlákniny s glukózou a samotné vlákniny zdravým ženám a pacientkám s bulimia nervosa

¹Hana Doubková, ¹Jana Kopečková, ¹Dana Sedláčková,

³Martin Haluzík, ¹Hana Kvasničková, ²Hana Papežová,

¹Vojtěch Hainer, ¹Jara Nedvídková

¹Endokrinologický ústav Praha, Laboratoř klinické a experimentální neuroendokrinologie

²Univerzita Karlova Praha, 1. lékařská fakulta, Psychiatrická klinika VFN

³Univerzita Karlova Praha, 1. lékařská fakulta, III. interní klinika VFN

SOUHRN

Východisko. Nedávný objev nového peptidového hormonu obestatinu, odvozeného od stejného genu jako ghrelin, přidal další poznatky ke komplexnosti fyziologie ghrelinu. I tak však zůstává nezodpovězených mnoho otázek, včetně vlivu složení potravy na regulaci orexigenního ghrelinu a obestatinu považovaného spíše za anorexigen. V této studii byl sledován vliv složení kalorické a nekalorické potravy na plazmatické hladiny ghrelinu a obestatinu u zdravých žen ($n = 6$; věk $23,83 \pm 1,1$ let; BMI $20,85 \pm 0,87$ kg/m²) a u žen s bulimií nervosa ($n = 6$; věk $26,6 \pm 5,2$ let; BMI $19,2 \pm 1,44$ kg/m²) charakterizovaných abnormálním jídelním chováním a narušenou energetickou rovnováhou.

Metody a výsledky. Plazmatické hladiny ghrelinu a obestatinu byly měřeny po celonočním hladovění před a po podání rozpustné vlákniny nebo vlákniny s glukózou. Hladiny hormonů byly stanoveny pomocí radioimunologických kitů. U obou skupin žen se hladiny ghrelinu a obestatinu po podání rozpustné vlákniny v průběhu křivky významně neměnily. Po podání rozpustné vlákniny s glukózou byl zjištěn významný pokles ghrelinu i obestatinu u pacientek s bulimií nervosa i u zdravých žen, a to postupně v prvních 30–90 minutách po požití. Poté se hladiny obou hormonů vracely k preprandiálním hodnotám.

Závěry. Postprandiální plazmatické hladiny ghrelinu i obestatinu klesají v závislosti na kalorickém obsahu potravy u zdravých žen i u pacientek s bulimií nervosa.

Klíčová slova: bulimia nervosa, ghrelin, obestatin, rozpustná vláknina.

SUMMARY

Doubková H, Kopečková J, Sedláčková D, Haluzík M, Kvasničková H, Papežová H, Hainer V, Nedvídková J. *Changes of plasma obestatin and ghrelin levels after soluble fiber with glucose and after fiber alone in healthy women and in patients with bulimia nervosa*

Background. The recent identification of obestatin, a novel peptide hormone derived from the same gene as ghrelin, has added further complexity to ghrelin physiology. Despite the rapid progress, many questions remain unanswered, including the regulation of orexigen ghrelin and putative anorexigen obestatin secretion by food composition in humans. The present study was undertaken to investigate the influence of caloric and noncaloric food on plasma ghrelin and obestatin concentrations in healthy women ($n = 6$; age 23.83 ± 1.1 years; BMI 20.85 ± 0.87 kg/m²) and in bulimia nervosa patients ($n = 6$; age 26.6 ± 5.2 years; BMI 19.2 ± 1.44 kg/m²), characterized by abnormal eating behaviour and imbalance in energy homeostasis.

Methods and Results. After overnight fasting, plasma ghrelin and obestatin were measured by commercial radioimmunoassay kits before and after consumption of soluble fiber alone or with glucose. In both groups plasma ghrelin and obestatin levels did not change after fiber alone, but decreased after fiber with glucose. During 30–90 min after ingestion we observed significant decrease ($p < 0.05$) of plasma ghrelin and obestatin levels after soluble fiber with glucose in healthy women and also in patients with bulimia nervosa, after then the levels of both hormones started to increase to preprandial levels.

Conclusions. We conclude that postprandial ghrelin and obestatin plasma levels decrease in relation to caloric content of the meal in healthy women and in patients with bulimia nervosa.

Key words: bulimia nervosa, ghrelin, obestatin, fiber.

Do.

Čas Lék čes 2010; 149: 542–545

Adresa pro korespondenci:

RNDr. Jara Nedvídková, PhD.

Endokrinologický ústav

Národní 8, 116 94 Praha 1

fax: +420 224 905 325, e-mail: jnedvidkova@endo.cz

ÚVOD

Peptidy, které jsou produkty osy gastrointestinální trakt – mozek, se významnou měrou podílejí na regulaci energetické homeostázy a jídelního chování u člověka. Mezi tyto peptidy patří gastrointestinální hormon ghrelin a nedávno objevený obestatin (1, 2). Ghrelin je produkován převážně v žaludku, ale jeho exprese byla zjištěna i v dalších periferních a centrálních tkáních. Předpokládá se, že ghrelin je orexigenním faktorem, který stimuluje příjem potravy a moduluje energetickou rovnováhu (3). Gastrointestinální peptid obestatin byl objeven Zhangem et al. (4) jako produkt posttranslační úpravy preproghrelinové molekuly, podobně jako je tomu u ghrelu. Zhang et al. a také další autoři (4, 5) pozorovali, že injekční aplikace obestatinu do třetí mozkové komory myši navodila omezení příjmu potravy. Většina autorů pozdějších studií však anorexigenní vlastnosti obestatinu neprokázala (6–9). V naší předchozí studii jsme pozorovali zvýšené bazální plazmatické hladiny jak ghrelu, tak obestatinu u pacientek s anorexia nervosa a nižší bazální plazmatické hladiny ghrelu a obestatinu u obézních osob (10).

Při zpracování potravy v gastrointestinálním traktu je významná aktivace chemo- a mechanoreceptorů. Objem jídla nebo jeho složení jsou kontrolovány zpětnovazebnými signály sytosti ze žaludku, tenkého střeva, jater a tukových zásob. Jak ghrelin, tak obestatin jsou po příjmu potravy uvolňovány do krevního oběhu. Optimalizují trávicí proces, podílejí se na energetické rovnováze organismu a ovlivňují jeho fyziologický stav a jídelní chování. Dosud je málo známo o vlivu složení potravy na plazmatické hladiny ghrelu a obestatinu u člověka. Významnou esenciální komponentou zdravé výživy je kromě živin (nutrientů) také rozpustná vláknina známá svým vysokým sytícím efektem.

Cílem této studie bylo sledování vlivu rozpustné vlákniny (Psyllium) a rozpustné vlákniny obohacené glukózou ve stejném objemu na postprandiální plazmatické hladiny orexigenního ghrelu a putativního anorexigenu obestatinu u zdravých kontrolních žen a u žen s onemocněním bulimia nervosa (BN) s narušeným jídelním chováním a poruchami energetické rovnováhy (11).

SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

Studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena etickou komisí Endokrinologického ústavu v Praze. Všechny účastnice podepsaly před zahájením studie informovaný souhlas s účastí ve studii.

Sledovaný soubor tvořilo šest žen s onemocněním bulimia nervosa diagnostikovaných podle DSM-IV (4th edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 1994), (věk $26,6 \pm 5,2$ let; BMI $19,2 \pm 1,44$ kg/m²), hospitalizovaných na Psychiatrické klinice 1. LF UK a VFN v Praze, a šest zdravých žen (věk $23,83 \pm 1,1$ let; BMI $20,85 \pm 0,87$ kg/m²). Pacientky s BN byly klinicky stabilizované a relativně v dobrém zdravotním stavu s výjimkou jejich narušeného jídelního chování a amenorey. U těchto pacientek byla průměrná frekvence přejídání a zvracení $2,8 \times$ za den a průměrná délka onemocnění poruchou příjmu potravy 5 let a 6 měsíců. Všechny nemocné se zúčastnily studie týden po jejich přijetí k hospitalizaci na psychiatrické klinice. Zdravé kontrolní ženy netrpěly žádným akutním ani chronickým onemocněním, při odběrech krve byly ve folikulární fázi menstruačního cyklu. Obě skupiny žen naposledy konzumovaly potravu v 18.00 hodin v den před experimentem a byly požádány o celonoční hladovění. Všechny účastnice studie se dostavily k odběrům do Endokrinologického ústavu v 7.00 hodin ráno. Studie trvala 4 hodiny a sestávala z konzumace rozpustné vlákniny a krevních odběrů. Před jejím zahájením bylo měřeno tělesné složení metodou bioimpedance (Tanita, Japan), výška a hmotnost probandek a bylo provedeno standardní lékařské vyšetření.

Popis studie

Každá účastnice studie vypila během 15 minut 4 gramy rozpustné vlákniny (Psyllium) ve 300 ml vody (celkový energetický obsah 0,48 kJ). Po uplynutí jednoho týdne se tytéž ženy účastnily experimentu, při kterém během 15 minut vypily Psyllium obohacené o 78 g glukózy, společně rozpuštěné ve 300 ml vody (celkový energetický obsah 1255,5 kJ). V obou testech byla vláknina smíchána s vodou 12 hodin před konzumací.

Tab. 1. Preprandiální (0 min) a postprandiální (30, 60, 90, 150, 210 min) hladina plazmatického ghrelu a obestatinu u pacientek s BN a u kontrolních žen. Počet kontrolních žen i pacientek je 6, hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM

Pacientky s BN						
	0 min	30 min	60 min	90 min	150 min	210 min
Obestatin 1 (pg/ml)	249 \pm 42,5*	245 \pm 41,0	253 \pm 40,3	253 \pm 42	267 \pm 29,0*	264 \pm 46,4
Obestatin 2 (pg/ml)	239 \pm 42,3*	216 \pm 38,4*	223 \pm 45*	222 \pm 44,2*	232 \pm 24,7	243 \pm 23,6
GhreTot 1 (pg/ml)	1288 \pm 362	1321 \pm 338	1309 \pm 338	1314 \pm 346	1330 \pm 427	1403 \pm 392*
GhreTot 2 (pg/ml)	1178 \pm 290	1025 \pm 185*	934 \pm 181,4*	942 \pm 156*	1001 \pm 136,5*	1092 \pm 235,4
Zdravé kontroly						
	0 min	30 min	60 min	90 min	150 min	210 min
Obestatin 1 (pg/ml)	208 \pm 80	199 \pm 58,0	217 \pm 41,4	204 \pm 46,6	205 \pm 49,5	225 \pm 48
Obestatin 2 (pg/ml)	217 \pm 41,7	193 \pm 43,3*	200 \pm 32,7*	185 \pm 37,2*	209 \pm 48,7	228 \pm 46,7
GhreTot 1 (pg/ml)	794 \pm 303,5	815 \pm 341	861 \pm 250,4	798 \pm 352,3	799 \pm 274	910 \pm 318*
GhreTot 2 (pg/ml)	859 \pm 316,3	730 \pm 297*	662 \pm 242*	676 \pm 273,4*	772 \pm 260,7*	968,3 \pm 334*

GhreTot 1 – plazmatické hladiny ghrelu po podání rozpustné vlákniny

GhreTot 2 – plazmatické hladiny ghrelu po podání rozpustné vlákniny s glukózou

Obestatin 1 – plazmatické hladiny obestatinu po podání rozpustné vlákniny

Obestatin 2 – plazmatické hladiny obestatinu po podání rozpustné vlákniny s glukózou

+ hladina významnosti $p < 0,05$ bazální hodnoty obestatinu v plazmě mezi skupinami

*označuje rozdíl v hladině hormonu ve srovnání s preprandiální hodnotou (čas 0 min), hladina významnosti $p < 0,05$

Sledovaným ženám byla v 7.30 hodin po celonočním půstu odebrána krev z loketní žíly do zkumavek s Na₂EDTA a aprotininem (inhibice proteáz) pro získání plazmy. První odběr byl proveden před jídlem v čase 0 a další odběry následovaly po jídle v časech 30, 60, 90, 150 a 210 minut. Bezprostředně po odběru byla krev uložena do ledové lázně, centrifugována 20 minut při 4° C a získaná plazma byla zamrazena při -30° C až do doby stanovení vzorků (tab. 1).

Analýza vzorků

Immunoreaktivita plazmatického obestatinu byla měřena komerčním radioimunologickým (RIA) kitem společnosti Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, USA. Intra- a interassay variabilita byla 5,0 % a 14,2 %, senzitivita byla 50 pg/ml. Celkový plazmatický ghrelin byl stanoven komerčním kitem společnosti Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, USA. Intra- a interassay variabilita pro celkový ghrelin byla 6,4 % a 16,3 %, senzitivita byla 93 pg/ml.

Statistická analýza

Závislost hormonálních hladin na statutu pacienta a fázi jídelního testu byla vyhodnocena s užitím ANOVA modelu pro opakovaná měření zahrnujícího faktory subjekt, status pacienta a fáze jídelního testu. ANOVA model následovala vícenásobná porovnávání s užitím metody nejmenšího významného rozdílu. Pro testování byla zvolena hladina statistické významnosti $p < 0,05$. Z důvodu negaussovského rozdělení u všech závisle proměnných byly tyto podrobeny mocninným transformacím k dosažení distribuční symetrie a konstantního rozptylu v datech i reziduích.

VÝSLEDKY

V naší studii jsme zjistili postprandiální pokles plazmatických hladin celkového ghreluinu a obestatinu po konzumaci rozpustné vlákniny obohacené o glukózu, a to u zdravých žen i pacientek s BN. Bazální plazmatické hladiny ghreluinu nebyly u kontrolních žen a pacientek s BN významně odlišné, i když byl pozorován trend k vyšším hladinám u pacientek s BN (velké individuální odchylky). Bazální plazmatické hladiny obestatinu byly u pacientek s bulimia nervosa významně vyšší ($p < 0,05$).

Celkový plazmatický ghrelin poklesl u kontrolních žen z průměrné bazální hodnoty 859 ± 316 pg/ml na 662 ± 242 pg/ml v 60. minutě (největší pokles, $p < 0,05$). Podobně poklesla u zdravých žen plazmatická hladina obestatinu z průměrné bazální hodnoty 217 ± 41 na 185 ± 37 pg/ml v 90. minutě po podání vlákniny s glukózou (největší pokles, $p < 0,05$). U pacientek s BN poklesl celkový plazmatický ghrelin po podání vlákniny s glukózou z průměrné hladiny 1178 ± 290 pg/ml na hodnotu 934 ± 181 pg/ml v 60. minutě (největší pokles, $p < 0,05$). Plazmatické hladiny obestatinu poklesly u pacientek s BN po podání vlákniny s glukózou z průměrné bazální hodnoty 239 ± 42 pg/ml na 216 ± 38 pg/ml ve 30. min (největší pokles, $p < 0,05$). Podání samotné rozpustné vlákniny nevedlo ke statisticky významným změnám v plazmatických hladinách sledovaných hormonů, a to jak u zdravých žen, tak u pacientek s BN. Výjimkou byly hodnoty v poslední 210. minutě, kdy došlo k významnému zvýšení plazmatických hladin ghreluinu oproti preprandiální hodnotám u obou sledovaných skupin (pacientky s BN: 1403 ± 392 pg/ml vs. 1288 ± 362 pg/ml, $p < 0,05$; kontroly: 910 ± 318 pg/ml vs. 794 ± 303 , $p < 0,05$).

DISKUZE

V této studii byl sledován vliv konzumace nekalorické a kalorické stravy o stejném objemu na plazmatické hladiny orexigenního hormonu ghreluinu a putativního anorexigenu obestatinu v postprandiální době u zdravých žen a pacientek s BN. Tyto dva gastrointestinální hormony jsou intenzivně sledovány. Předpokládá se, že se významně uplatňují v poruchách regulace příjmu potravy a pocitu sytosti, kam jsou řazeny zejména pacientky s onemocněním anorexia a bulimia nervosa. V předcházející studii jsme pozorovali podobný pokles plazmatických hladin ghreluinu a obestatinu u zdravých žen po snídani s převládajícím sacharidovým obsahem. Ukázali jsme, že sekrece obestatinu je vyšší ve srovnání s ghrelinem u BN pacientek v porovnání s jejich sekrecí u zdravých žen (2).

V této studii jsme pozorovali signifikantně vyšší bazální plazmatické hladiny obestatinu ($p < 0,05$), ne však ghreluinu (vyšší rozptyl hodnot), u pacientek s BN oproti kontrolním ženám, přestože obě skupiny měly obdobný body mass index (BMI). Tanaka et al. (12) pozoroval vyšší hladiny ghreluinu u pacientek s BN se stejným BMI, jako měly zdravé ženy. Konzumace rozpustné vlákniny obohacené glukózou vyvolala u našich probandek pokles plazmatických hladin jak ghreluinu, tak i obestatinu. Sekrece ghreluinu a obestatinu je stimulována řadou faktorů, jako jsou nervové faktory (prostřednictvím n. vagus), mechanické (distenze žaludku) nebo chemické faktory (obsah a složení makronutrientů v potravě). Odpověď plazmatického ghreluinu na stravu může být ovlivněna typem nutrientů a celkovým energetickým obsahem dané potravy, jak jsme již dříve, podobně jako i jiní autoři, pozorovali u pacientek s mentální anorexií po standardní snídani (1, 13–15). Námi pozorovaný pokles plazmatických hladin ghreluinu a současně i obestatinu po podání vlákniny s glukózou může poukazovat na význam jak ghreluinu, tak obestatinu při regulaci příjmu potravy u lidí.

Neočekávaně jsme pozorovali, že po podání samotné rozpustné vlákniny jak zdravým ženám, tak pacientkám s BN nedošlo k významným změnám v plazmatických hladinách ghreluinu i obestatinu s výjimkou posledního sledovaného času (210. minuta). To znamená, že pokles plazmatického ghreluinu a obestatinu byl odlišný po kalorické a nekalorické stravě u obou sledovaných skupin.

Shiia et al. (16) zjistili u zdravých osob, že plazmatická hladina ghreluinu klesá rovněž po intravenózním podání glukózy, což znamená, že sekrece ghreluinu nemusí být ovlivněna jen průchodem jídla žaludkem, tedy jeho expanzí (16). Tyto nálezy by mohly ukazovat, že akutní odpověď plazmatické hladiny ghreluinu a obestatinu je pouze částečně závislá na přítomnosti potravy v žaludku, ale pravděpodobně také závisí na nutriční hodnotě potravy a její odezvě ve změně hladiny glukózy v krvi a aktivaci jiných tkání mimo žaludek. Záleží i na trvání příjmu potravy.

ZÁVĚR

Závěrem konstatujeme, že rozpustná vláknina obohacená glukózou významně modifikovala postprandiální signál pocházející z gastrointestinálního traktu; výsledky ukázaly, že krátkodobá odpověď plazmatické hladiny ghreluinu a obestatinu je závislá na kalorické hodnotě stravy téhož objemu jak u pacientek s BN, tak u zdravých žen. Výsledky této studie ukazují spíše na paralelní změny sekrece ghreluinu a obestatinu za fyziologických podmínek, ale také za patologických podmínek charakterizovaných energetickou nerovnováhou, což nás vede k úvaze, že porušený metabolický stav může potenciálně ovlivnit expresi preproghrelino-
vého genu nebo úpravu produktů jeho exprese. Rozhodující vliv na příjem potravy a energetickou homeostázu by mohl

rovněž záviset na poměru ghrelinu a obestatinu. Pro objasnění základních mechanismů spojených s chronickou potravní deprivací, jako je u pacientek s BN, je třeba provést další studie.

Zkratky

BMI – body mass index
BN – bulimia nervosa
SEM – střední chyba průměru

LITERATURA

1. Nedvídková J, Krykorková I, Barták V, Papežová H, Gold PW, Alesci S, Pacak K. Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1678–1682.
2. Sedláčková D, Dostálová I, Hainer V, Beranová L, Kvasničková H, Hill M, Haluzík M, Nedvídková J. Simultaneous Decrease of Plasma Obestatin and Ghrelin Levels after a High-Carbohydrate Breakfast in Healthy Women. *Physiol Res* 2008; 57(Suppl 1): S29.
3. Gasco V, Beccuti G, Marotta F, Benso A, Granata R, Broglio F, Ghigo E. Endocrine and Metabolic Actions of Ghrelin. *Endocr Dev* 2010; 17: 86–95.
4. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005; 310: 996–999.
5. Lagaud GJ, Young A, Acena A, Morton MF, Barrett TD, Shankley NP. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 264–269.
6. Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frere D, Tolle V, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B. Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: Constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 413–419.
7. Gourcerol G, Coskun T, Craft LS, Mayer JP, Heiman ML, Wang L, Million M, St-Pierre DH, Taché Y. Preproghrelin-derived peptide, obestatin, fails to influence food intake in lean or obese rodents. *Obesity* 2007; 15: 2643–2652.
8. Monteleone P, Serritella C, Martiadis V, Scognamiglio P, Maj M. Plasma obestatin, ghrelin, and Ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4418–4421.
9. Nakahara T, Harada T, Yasuhara D, Shimada N, Amitani H, Sakoguchi T, Kamiji MM, Asakawa A, Inui A. Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 252–255.
10. Zamrazilová H, Hainer V, Sedláčková D, Papežová H, Kunešová M, Bellisle F, Hill M, Nedvídková J. Plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women. *Physiol Res* 2008; 57(Suppl 1): S49–S55.
11. Vitiello B, Lederhendler I. Research on eating disorders: current status and future prospects. *Biol Psychiatry* 2000; 47: 777–786.
12. Tanaka M, Tatebe Y, Nakahara T, Yasuhara D, Sagiya K, Muranaga T, Ueno H, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T. Eating pattern and the effect of oral glucose on ghrelin and insulin secretion in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 574–579.
13. Erdmann J, Töpsch R, Lippl F, Gussmann P, Schudziarra V. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin and glucose. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3048–3054.
14. Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K. Short-term secretory regulation of the active form of ghrelin and total ghrelin during an oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 913–914.
15. Otto B, Tschöp M, Frühauf E, Heldwein W, Fichter M, Otto C, Cuntz U. Postprandial ghrelin release in anorectic patients before and after weight gain. *Psychoneuroendocrinology* 2005; 30: 577–581.
16. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MSW, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 240–244.

Práce vznikla za podpory grantu č. NR/ 9158-3 IGA MZ ČR a Výzkumného záměru MZOVFN2005.

Rádi bychom poděkovali paní Dianě Riegerové, Nadeždě Procházkové, Janě Novotné a Romaně Bajtlové za jejich technickou asistenci.